

Малый практикум по микробиологии. Часть 1.

Общая микробиология

учебно-методическое пособие для вузов

Гуреева М.В.

Руденко Т.С.

Грабович М.Ю.

УДК 579.23

ББК 28.4

Рецензенты: Черепухина Ирина Вячеславовна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории маркер–ориентированной селекции ФГБНУ «ВНИИСС им. А. Л. Мазлумова»

Семенихина Анастасия Владимировна, к.б.н., доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии Воронежского государственного университета

Учебно-методическое пособие подготовлено на кафедре биохимии и физиологии клетки медико–биологического факультета Воронежского государственного университета

Рекомендуется для студентов медико–биологического факультета, отделение фундаментальной медицины

Малый практикум по микробиологии. Часть 1. Общая микробиология: учебно-методическое пособие для вузов. [Для студентов медико–биологического факультета, отделение фундаментальной медицины].
Гуреева М.В., Руденко Т.С., Грабович М.Ю.

Оглавление

Тема 1. Микроскопическая техника в микробиологии. Приготовление микроскопических препаратов.....	4
Тема 2. Морфология микроскопических грибов.....	17
Тема 3. Морфология прокариот	26
Тема 4. Посев микроорганизмов из почвы, воды, воздуха	30
Тема 5. Учет микроорганизмов в посевах. Выделение в чистую культуру..	40
Тема 6. Идентификация бактерий – определение бактерий до рода. Окраска по Граму	44
Тема 7. Окрашивание спор и жгутиков	48
Тема 8. Азотфиксация. Аммонификация.....	51
Тема 9. Брожение: молочнокислое, маслянокислое, спиртовое.....	57
Тема 10. Анаэробное дыхание: нитратредуцирующие и сульфатредуцирующие бактерии	65
Тема 11. Методы обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов	74
Тема 12. Антибиотикочувствительность.....	86
Библиографический список.....	91

Тема 1. Микроскопическая техника в микробиологии. Приготовление микроскопических препаратов

Цели занятия:

- 1) Познакомиться с устройством и принципом работы светового микроскопа;
- 2) Научиться готовить микроскопические препараты живых бактерий: висячая капля, раздавленная капля;
- 3) Научиться готовить микроскопические препараты убитых бактерий.

Материалы и оборудование: микроскопы, предметные стекла, предметные стекла с лункой, покровные стекла, микробиологические петли, промывалки, спиртовки, спирт, спички, маркеры, культура сенной палочки.

Устройство светового микроскопа

Микроскоп – это оптический прибор, позволяющий получить обратное изображение изучаемого объекта и рассмотреть мелкие детали его строения, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности глаза.

Разрешающая способность микроскопа дает отдельное изображение двух близких друг другу линий. Невооруженный человеческий глаз имеет разрешающую способность около 1/10 мм или 100 мкм. Лучший световой микроскоп примерно в 500 раз улучшает возможность человеческого глаза, т. е. его разрешающая способность составляет около 0,2 мкм или 200 нм.

Разрешающая способность и увеличение не одно и то же. Если с помощью светового микроскопа получить фотографии двух линий, расположенных на расстоянии менее 0,2 мкм, то, как бы не увеличивать изображение, линии будут сливаться в одну. Можно получить большое увеличение, но не улучшить его разрешение.

Различают *полезное* и *бесполезное* увеличения. Под полезным понимают такое увеличение наблюдаемого объекта, при котором можно выявить новые детали его строения. Бесполезное – это увеличение, при

котором, увеличивая объект в сотни и более раз, нельзя обнаружить новых деталей строения. Например, если изображение, полученное с помощью микроскопа, увеличить еще во много раз, спроецировав его на экран, то новые, более тонкие детали строения при этом не выявятся, а лишь соответственно увеличатся размеры имеющихся структур.

В учебных лабораториях обычно используют *световые микроскопы*, на которых микропрепараты рассматриваются с использованием естественного или искусственного света. Наиболее распространены *световые биологические микроскопы*: БИОЛАМ, МИКМЕД, МБР (микроскоп биологический рабочий), МБИ (микроскоп биологический исследовательский) и МБС (микроскоп биологический стереоскопический). Они дают увеличение в пределах от 56 до 1350 раз. *Стереомикроскоп* (МБС) обеспечивает подлинно объемное восприятие микрообъекта и увеличивает от 3,5 до 88 раз.

В микроскопе выделяют две системы: *оптическую* и *механическую*. К *оптической системе* относят объективы, окуляры и осветительное устройство (конденсор с диафрагмой и светофильтром, зеркало или электроосветитель).

Рассмотрим конструкцию световых микроскопов на примере микроскопа отечественного производства Микмед – 1 (рис.1).

Объектив – одна из важнейших частей микроскопа, поскольку он определяет *полезное увеличение объекта*. Объектив состоит из металлического цилиндра с вмонтированными в него линзами, число которых может быть различным. Увеличение объектива обозначено на нем цифрами. В учебных целях используют обычно объективы х8 (х10) и х40. Иммерсионный объектив (х100), используется для изучения наиболее мелких объектов.

Качество объектива определяет его разрешающая способность.

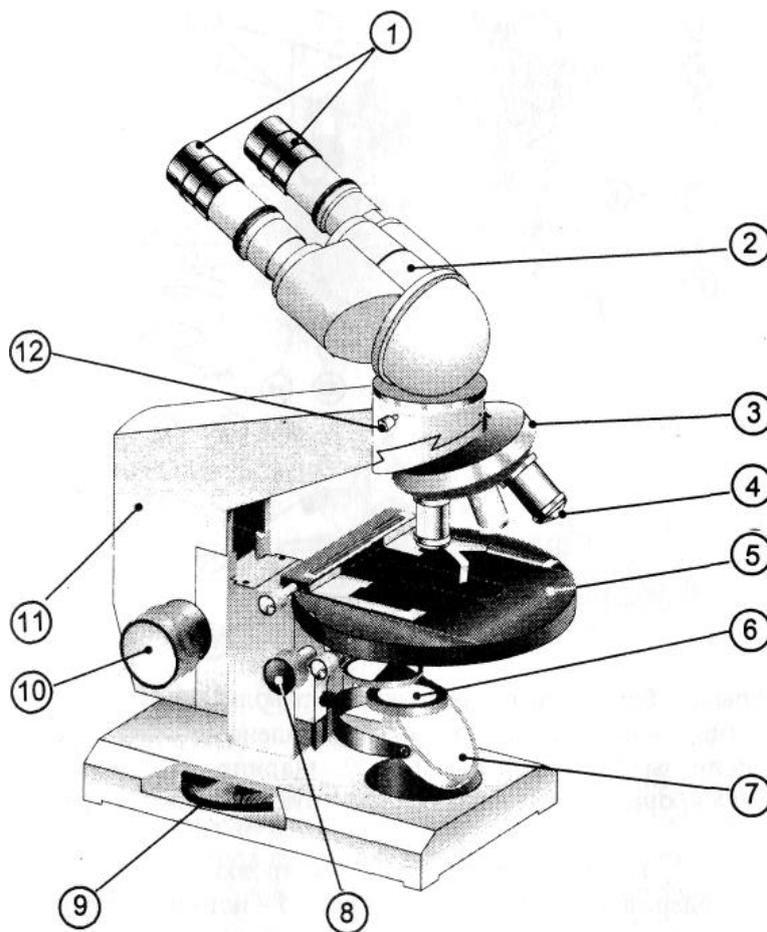


Рис. 1. Устройство светового микроскопа Микмед –1. 1 – окуляры; 2 – бинокулярная насадка; 3 – револьверное устройство; 4 – объектив; 5 – предметный столик; 6 – конденсор; 7 – зеркало; 8 – винт перемещения кронштейна конденсора; 9 – винт тонкой фокусировки; 10 – винт грубой фокусировки; 11 – тубусодержатель; 12 – винт для крепления насадки.

Разрешающая способность – это наименьшее расстояние, на котором две ближайшие точки объектива воспринимаются раздельно. Для пучка лучей, параллельных оптической оси микроскопа, она определяется по формуле:

$$E = \lambda/A,$$

где E – разрешающая способность объектива, λ – длина волны источника света, A – апертура объектива.

Для наклонных лучей разрешающая способность в 2 раза выше:

$$E = \lambda/2A,$$

Длина волны лучей источника света в видимой части спектра может меняться от 0,4 мкм (400 нм) для фиолетовых лучей до 0,7 мкм (700 нм) для красных. Следовательно, чем короче длина волны лучей источника света и чем больше апертура объектива, тем выше разрешающая способность объектива микроскопа, т. е. тем более тонкие структуры мы сможем увидеть в микроскоп. При освещении объекта наклонными лучами разрешающая способность объектива микроскопа в 2 раза выше, чем при освещении прямо падающими лучами. Освещая препарат синими лучами ($\lambda = 0,47$ мкм), т. е. применяя в осветителе синий светофильтр, можно изучать более тонкие структуры, чем при освещении обычным белым светом.

Пример: для объектива с $A=1,4$ при освещении белым светом ($\lambda = 0,55$ мкм) диаметр наименьшей видимой частицы при прямо падающем свете равен 0,39 мкм, при косом освещении – 0,20 мкм, а при освещении синим светом – 0,34 и 0,17 мкм, соответственно. Максимальное разрешение, которое можно получить при использовании светового микроскопа, 0,20 – 0,35 мкм. Увеличить разрешающую способность можно при использовании ультрафиолетового света (длина волны 0,26 – 0,28 мкм), что позволяет получить разрешение 0,13 – 0,14 мкм.

Числовая, или нумерическая, апертура (A) объектива характеризует светособирательную способность и определяется по формуле

$$A = n \cdot \sin \alpha,$$

где n – показатель преломления среды между фронтальной линзой объектива и покровным стеклом; α – половинный угол входного отверстия объектива (угол, одна сторона которого совпадает с оптической осью, другая образована линией, соединяющей точку выхода лучей из объектива с границей действующего отверстия объектива) (рис. 2).

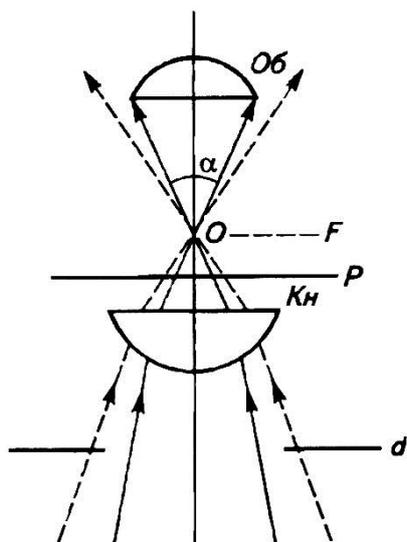


Рис. 2. Угол отверстия объектива микроскопа: Об – объектив; Кн – конденсор; P – плоскость препарата; F – фронтальная плоскость; α – угол отверстия объектива.

Различают слабые объективы ($A=0,02-0,25$), средние объективы ($A=0,3-0,65$) и сильные объективы ($A=0,7-1,6$).

Все объективы по способу применения делят на сухие и иммерсионные (от лат. *Immersio* – погружаю или окунаю). У сухих объективов между фронтальной линзой и рассматриваемым препаратом находится воздух. Воздух и стекло имеют разные показатели преломления света (соответственно 1,0 и 1,52), в результате чего лучи света, переходя из одной среды в другую, преломляются, рассеиваются, происходит частичное искажение рассматриваемых объектов (рис. 3). У иммерсионных объективов пространство между фронтальной линзой и препаратом заполнено, как правило, кедровым маслом или водой. Предметное стекло, стекло объектива и кедровое масло имеют почти одинаковый показатель преломления света (1,52 и 1,515), поэтому лучи, проходя из одной среды в другую, почти не преломляются, свет не рассеивается, рассматриваемые объекты не искажаются. Показатель преломления света, близкий к таковому стекла, имеют и другие вещества, которые используются в качестве иммерсионных составов: касторовое масло (1,48–1,49), гвоздичное масло (1,53), смесь касторового и гвоздичного масел (1,515).

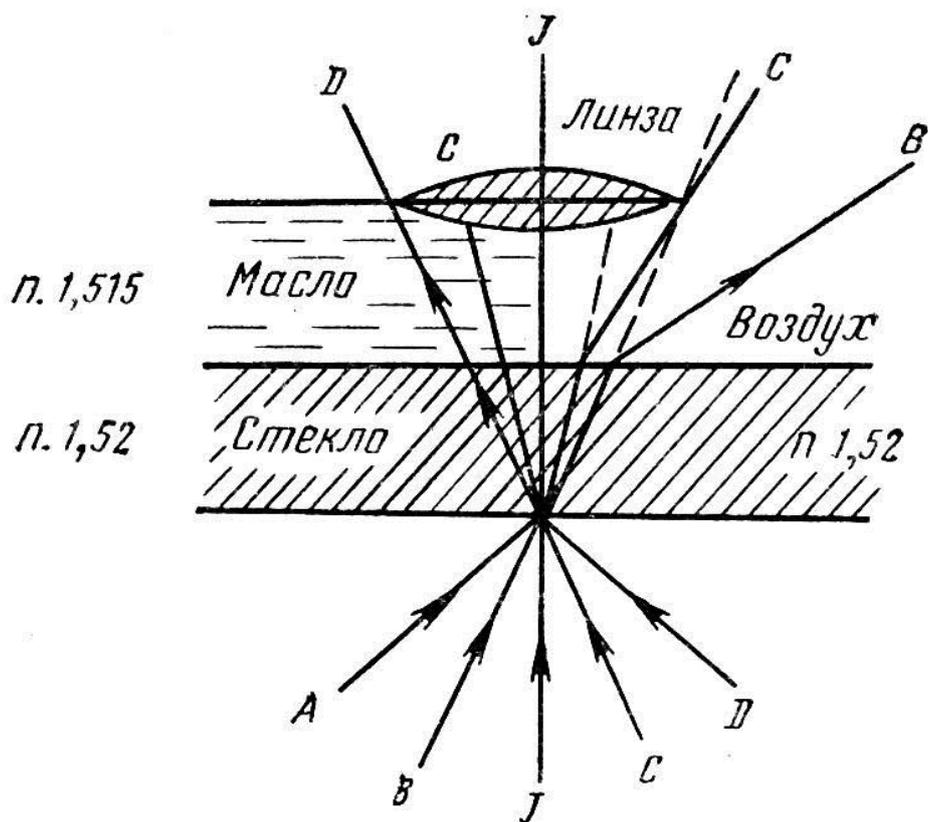


Рис. 3. Ход лучей между конденсором и объективом микроскопа. Справа – сухой объектив, слева – иммерсионный.

При работе с иммерсионными объективами следует соблюдать осторожность, чтобы при опускании тубуса не повредить линзу.

Иммерсионную жидкость наносят между линзой и объективом в виде капли на поверхность покровного стекла препарата и, опуская затем тубус, погружают линзу в каплю иммерсии. Иммерсионную жидкость можно нанести и на поверхность линзы объектива либо по капле и на препарат, и на объектив. Главное требование — создание иммерсии без пузырьков воздуха.

Окуляр устроен намного проще объектива. Он состоит из 2–3 линз, смонтированных в металлический цилиндр. Между линзами расположена постоянная диафрагма, определяющая границы поля зрения. Нижняя линза фокусирует изображение объекта, построенное объективом в плоскости диафрагмы, а верхняя служит непосредственно для наблюдения. Увеличение окуляров обозначено на них цифрами: x7, x10, x15. Окуляры не выявляют

новых деталей строения, и в этом отношении их увеличение *бесполезно*. Таким образом, окуляр, подобно лупе, дает прямое, мнимое, увеличенное изображение наблюдаемого объекта, построенное объективом. В зависимости от количества окуляров микроскопы подразделяют на монокуляры, бинокюляры и тринокюляры.

Для определения *общего увеличения микроскопа* следует умножить увеличение объектива на увеличение окуляра.

Осветительное устройство состоит из зеркала или электроосветителя, конденсора с ирисовой диафрагмой и светофильтром, расположенных под предметным столиком. Они предназначены для освещения объекта пучком света.

Зеркало служит для направления света через конденсор и отверстие предметного столика на объект. Оно имеет две поверхности: плоскую и вогнутую. В лабораториях с рассеянным светом используют вогнутое зеркало.

Электроосветитель устанавливается под конденсором в гнездо подставки.

Конденсор состоит из 2–3 линз, вставленных в металлический цилиндр. При подъеме или опускании его с помощью специального винта соответственно конденсируется или рассеивается свет, падающий от зеркала на объект. Конденсоры тоже имеет определенную числовую апертуру. Если апертура конденсора меньше апертуры объектива, то возможности объектива, таким образом, используются в работе неполностью.

Ирисовая диафрагма расположена между зеркалом и конденсором. Она служит для изменения диаметра светового потока, направляемого зеркалом через конденсор на объект, в соответствии с диаметром фронтальной линзы объектива и состоит из тонких металлических

пластинок. С помощью рычажка их можно то соединить, полностью закрывая нижнюю линзу конденсора, то развести, увеличивая поток света.

Кольцо с матовым стеклом или *светофильтром* уменьшает освещенность объекта. Оно расположено под диафрагмой и передвигается в горизонтальной плоскости.

Механическая система микроскопа состоит из подставки, коробки с микрометрическим механизмом и микрометрическим винтом, тубуса, тубусодержателя, винта грубой наводки, кронштейна конденсора, винта перемещения конденсора, револьвера, предметного столика.

Подставка – это основание микроскопа.

Коробка с микрометрическим механизмом, построенном на принципе взаимодействующих шестерен, прикреплена к подставке неподвижно. Микрометрический винт (*микровинт*) служит для незначительного перемещения тубусодержателя, а, следовательно, и объектива на расстояния, измеряемые микрометрами. Полный оборот микрометрического винта передвигает тубусодержатель на 100 мкм, а поворот на одно деление опускает или поднимает тубусодержатель на 2 мкм. Во избежание порчи микрометрического механизма разрешается крутить микрометрический винт в одну сторону *не более чем на половину оборота*.

Тубус или *трубка* – цилиндр, в который сверху вставляют окуляры. Тубус подвижно соединен с головкой тубусодержателя, его фиксируют стопорным винтом в определенном положении. Ослабив стопорный винт, тубус можно снять.

Револьвер предназначен для быстрой смены объективов, которые ввинчиваются в его гнезда. Центрированное положение объектива обеспечивает защелка, расположенная внутри револьвера.

Тубусодержатель несет тубус и револьвер.

Винт грубой наводки (макрвинт) используют для значительного перемещения тубусодержателя, а, следовательно, и объектива с целью фокусировки объекта при малом увеличении.

Предметный столик предназначен для расположения на нем препарата. В середине столика имеется круглое отверстие, в которое входит фронтальная линза конденсора. На столике имеются две пружинистые клеммы – зажимы, закрепляющие препарат.

Кронштейн конденсора подвижно присоединен к коробке микрометрического механизма. Его можно поднять или опустить при помощи винта, вращающего зубчатое колесо, входящее в пазы рейки с гребенчатой нарезкой.

Типы световой микроскопии

В зависимости от свойств объекта свет изменяет свои физические свойства — цвет (длину волны), яркость (амплитуду волны), фазу, используются в современных микроскопах для создания контраста.

Для микроскопии окрашенных объектов пользуются самым простым из известных микроскопов — так называемым обычным (рис. 1). С его помощью исследуются препараты живых бактерий и окрашенные препараты убитых бактерий. Этот метод часто применяется в медицине, например для диагностики в мазках влагалищных трихомонад.

Темнопольная микроскопия обеспечивает наибольший возможный контраст изображения, но четкость его и полезное увеличение заметно ниже, чем при обычной микроскопии. Темнопольная микроскопия успешно применялась для изучения спирохет, лептоспир и других слабо окрашиваемых микроорганизмов.

Технически самостоятельным вариантом темнопольной микроскопии является *ультрамикроскопия*, при которой мельчайшие изучаемые частицы освещаются мощным боковым пучком света и видны точками на черном

фоне. Ультрамикроскопия позволяет подсчитывать частицы, оценивать их размеры и другие свойства. Применяется для изучения коллоидных растворов, аэрозолей, суспензий.

В последние годы темнопольная микроскопия применяется все реже, так как появился контрастирующий прибор со значительно лучшими характеристиками — *фазово-контрастный* микроскоп. Луч, прошедший через фон образца, в идеальном случае не претерпевает никаких изменений. Он проходит через точно определенные участки объектива. Луч, прошедший через объект, подвергается дифракции, т. е. распадается на пучки убывающей интенсивности, которые выходят из объекта под разными углами. Другие свойства луча (амплитуда, длина волны, фаза) изменяются в различных степенях в зависимости от особенностей объекта.

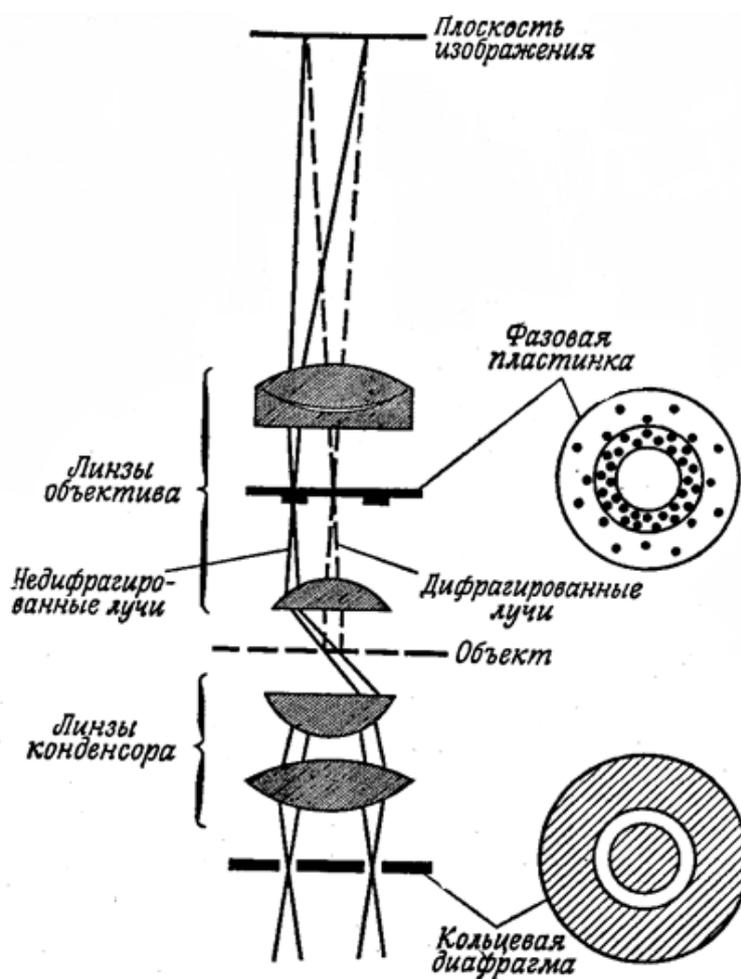


Рис. 4. Ход лучей при фазовом контрасте

Почти все живые микроскопические объекты выглядят в обычном микроскопе едва заметными, прозрачными, потому что они почти не изменяют ни амплитуды, ни цвета прошедшего через них луча.

Они изменяют только фазу его волны, но это изменение не улавливается ни глазом, ни фотопластинкой. Пучок лучей, дифрагированных объектом и сдвинутых им по фазе, проходит через те участки объектива, где не могут пройти прямые, недифрагированные лучи фона. Практически нетрудно определить, где именно пройдут эти лучи. Если накрыть этот участок одной из линз объектива полупрозрачной пластинкой, способной изменить фазу, интенсивность, цвет или все эти три свойства вместе, то изображение фона изменит свою фазу, уменьшится его яркость или преобразится цвет. Лучи, прошедшие через объект и отклоненные (дифрагированные) им, обойдут вложенную в объектив пластинку и, следовательно, не приобретут тех свойств, которые приобрели, пройдя через пластинку, лучи фона. В результате разница между лучами фона и объекта возрастет (рис. 4). Если разница фаз между лучами фона и объекта достигает $1/4$ длины волны, то в конечном изображении возникает заметный для глаза и фотопластинки контраст: темный объект на светлом фоне или, наоборот, в зависимости от структуры пластинки, которую в этом случае называют «фазовой».

Люминесцентная микроскопия широко применяется в научно–исследовательских и клинико–диагностических лабораториях. При этом живой объект обрабатывают специальными красителями, которые, будучи освещены синим, фиолетовым или ультрафиолетовым светом, начинают светиться, излучая более длинные волны (зеленые, желтые). Цвет возбужденного вторичного свечения зависит от химических свойств объекта и введенного в него красителя.

Приготовление микропрепаратов

В зависимости от цели исследования готовят препараты живых или убитых микроорганизмов. Препараты живых микроорганизмов позволяют получить представления о размере, форме, подвижности клеток, изучить их жизненный цикл. Однако эти препараты не предназначены для длительного хранения. В случае необходимости повторного использования готовят фиксированные препараты убитых микроорганизмов. Еще одно применение фиксированных препаратов – в медицине при работе с патогенами.

1. Препараты живых микроорганизмов.

А) Препарат «раздавленная капля»

На обезжиренное предметное стекло прокаленной петлей наносят каплю стерильной воды, в которую той же петлей вносят небольшое количество исследуемой культуры микроорганизма, взятой с твердой питательной среды. Из жидкой среды культуру берут вместе с каплей жидкости. Препарат накрывают покровным стеклом и микроскопируют сначала с объективом 10X (при этом фокусируются между покровным и предметным стеклом, ориентируясь по пузырькам воздуха), а затем с объективом 40X. На последнем увеличении уже можно рассмотреть морфологию клеток.

Препарат легко и быстро готовить, благодаря чему он получил широкое применение при первичной диагностике микроорганизмов. Однако он высыхает через 10–15 минут, поэтому для длительного наблюдения за живыми клетками не подходит.

Б) препарат «висячая капля»

Для приготовления препарата в центр покровного стекла наносят каплю исследуемого материала. Затем покровное стекло быстро поворачивают каплей вниз и кладут на предметное стекло с лункой, так чтобы капля оказалась посередине лунки. Чтобы предметное и покровное

стекло были плотно прилегали друг к другу, их склеивают между собой водой или вазелином. Капля оказывается висящей в герметически изолированном пространстве (рис. 5). При малом увеличении микроскопа (10X) находят край капли, далее исследуют препарат при большом увеличении (40X). Чтобы ограничить подвижность микроорганизмов, каплю исследуемой жидкости можно поместить в расплавленный и остуженный до $t^{\circ} 45^{\circ}$ агар.

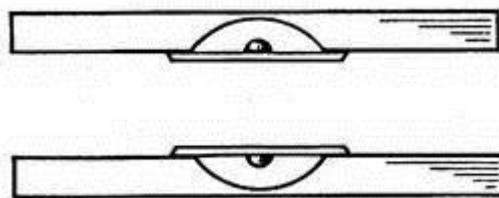


Рис. 5. Приготовление препарата «висячая капля»

Препарат «висячая капля» используется для многодневных наблюдений за исследуемым объектом, например, при изучении жизненного цикла микроорганизмов.

2. Препараты убитых микроорганизмов.

Для приготовления препарата убитых микроорганизмов на нижней стороне предметного стекла маркером рисуют кружок диаметром 2 см. Затем готовят мазок: стерильно отбирают микробиологической петлей каплю исследуемого материала и размазывают внутри кружка. Высушивают на воздухе. Фиксируют препарат в пламени спиртовки. Для этого трижды проводят стекло с мазком через пламя. Зафиксированный препарат микроскопируют при увеличении X40.

Для фиксации микроорганизмов можно использовать не только термический метод в пламени спиртовки, но и химические методы: при помощи 96 %-ого спирта, смеси спирта и эфира (смесь Никифорова), ацетона, формалина, осмиевой кислоты.

Фиксация проводится для того, чтобы убить микроорганизмы и прикрепить их к предметному стеклу. Фиксированные препараты микроскопируются без покровного стекла.

Задание:

- 1) Приготовить препарат «раздавленная капля».
- 2) Приготовить препарат «висячая капля».
- 3) Приготовить фиксированный препарат.

Тема 2. Морфология микроскопических грибов

Цели занятия:

- 1) Ознакомиться с морфологией микроскопических грибов;
- 2) Приготовить препараты «раздавленная капля» для дрожжей, муко́ра, пеницилла, аспергилла;
- 3) Микроскопировать фиксированные препараты аспергилла, пеницилла и шизосахаромицет.

Материалы и оборудование: микроскопы, предметные стекла, покровные стекла, промывалки с водой, микробиологические иглы, микробиологические петли, спиртовки, спирт, спички, чашки Петри с культурами муко́ра, аспергилла и пеницилла, суспензия дрожжей, фиксированные препараты аспергилла, пеницилла и шизосахаромицет.

Микроскопические грибы – эукариотические организмы. К ним относятся дрожжи и плесени. Как и все грибы, они являются аэробными микроорганизмами и по типу питания относятся к хемоорганогетотрофам. Большинство грибов – сапрофиты, но некоторые вызывают заболевания и являются паразитами.

Тело грибов – это грибница, или мицелий, состоящий из ветвящихся нитей, называемых гифами. Диаметр гифов, колеблется от 5 до 50 мкм. В зависимости от строения мицелия грибы делятся на многоклеточные одноядерные и одноклеточные многоядерные.

Мицелий может быть *септированный* (гифы разделены перегородками и имеют общую оболочку) и *несептированный* (представлен разветвлениями одной гифы без перегородок). Тканевые формы дрожжей могут быть представлены *псевдомицелием*, его образование — результат почкования одноклеточных грибов без отхождения дочерних клеток. *Общую оболочку псевдомицелий, в отличие от истинного, не имеет.*

Размножаются микроскопические грибы бесполом и половым путем. Оба способа связаны с образованием спор. Бесполое размножение осуществляется также фрагментами мицелия. Грибы, способные к половому размножению, относятся к совершенным грибам, неспособные — к несовершенным.

Спорообразующие структуры грибов называются *спорофорами*. Если терминальный конец спорофоры увеличивается по мере роста в размере, а затем превращается в закрытоеместилище спор, то этоместилище спор называется *спорангием* и содержит *спорангиеспоры*. Эти споры являются *эндоспорами* (внутренними).

Спорофоры, формирующие свободные споры, называются *конидиефорами* (или *конидиеносцами*), а свободные споры называются *экзоспорами* (наружными), или *конидиями*. Конидиеносцы представляет собой особые ветви мицелия, отличающиеся по строению и характеру ветвления от остальных гиф. Для некоторых видов грибов характерно тесное сплетение нескольких конидиеносцев в пучок. Такое сплетение называется *коремией*.

Есть грибы, конидиеносцы у которых заключены в округлое тело — *пикниду*. Она имеет твердую оболочку темного цвета и узкое отверстие наверху для выхода конидий. Пикнида защищает конидиеносцы и конидии от неблагоприятных воздействий внешней среды.

Для плесневых грибов цвет спор определяет и цвет всего гриба. Например, у мукора серые споры, у аспергилла черные, у пеницилла зеленые. Соответственно они выглядят как серая, черная и зеленая плесень.

Для приготовления препарата плесневых грибов очень осторожно (чтобы не разрушить органов спороношения) препаровальной иглой или ботаническим пинцетом снимают кусочек пленки гриба и переносят его в каплю воды, предварительно нанесенную на предметное стекло. Препарат осторожно, слегка придавливая, накрывают покровным стеклом и рассматривают под микроскопом на малом увеличении. При этом увеличении хорошо различается строение органов спороношения плесневых грибов. Для подробного изучения отдельных деталей строения (гиф, сумок и т.д.) препарат рассматривают на большом увеличении. При этом обязательно следует регулировать освещение с помощью диафрагмы для получения более четкого изображения рассматриваемых деталей.

Плесневые грибы

1) Одноклеточные многоядерные

У одноклеточных многоядерных грибов мицелий не поделён перегородками и представлен одной гигантской многоядерной разветвлённой клеткой.

Мукор (*Mucor* sp).

Род *Mucor* (рис. 6 А) объединяет более 50 видов грибов. Его представители могут развиваться в верхних слоях почвы, продуктах питания. Некоторые представители рода вызывают грибковые заболевания (мукомикоз). Мукомикоз относят к редким заболеваниям человека, но, возникнув, он может быть потенциально летальным. Микоз обычно возникает в результате аэрогенной инфекции или попадания спор с пищей; однако чаще развивается на фоне других болезней (туберкулеза, бруцеллеза, болезней крови и особенно диабета с выраженным сопутствующим

ацидозом) и др. Помимо человека, известны заболевания этим микозом у животных – собак, свиней, крупного рогатого скота, лошадей, морских свинок.

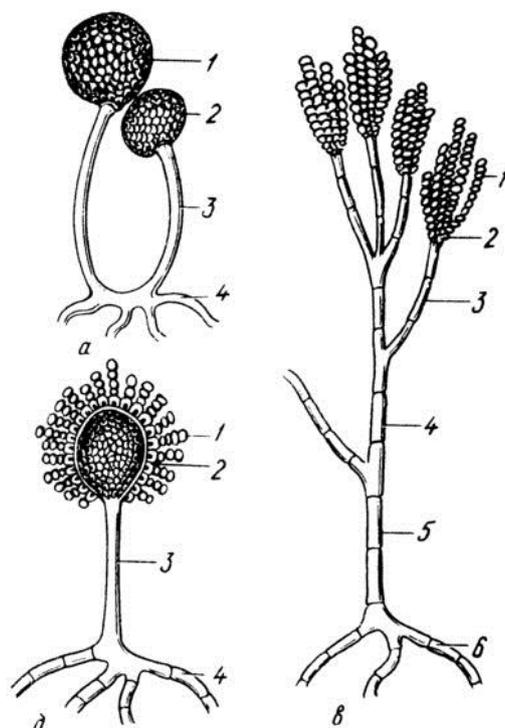


Рис. 6. Строение плесневых грибов: а – мукор. 1 – спорангий, 2 – спорангиеспоры, 3 – спорангиеносец, 4 – мицелий; б – аспергилл. 1 – конидии, 2 – стеригмы, 3 – конидиеносец, 4 – гифы мицелия; в – пеницилл. 1 – конидии, 2 – фиалиды, 3 – метулы, 4 – веточки, 5 – конидиеносец, 6 – гифы мицелия.

Начало болезни часто связывают с вдыханием элементов грибов; в последующем развиваются микотический бронхит, реже пневмония («легочной мукороз»). При пневмомикозе на вскрытии обнаруживались обширные казеозные участки, вокруг которых наблюдалось разрастание фиброзной ткани. В процесс вовлекаются также лимфатические узлы, плевра, иногда диафрагма. **Микроскопически:** очаги поражения представлены некротизированной тканью, окружены небольшим количеством палочкоядерных лейкоцитов, плазматическими клетками и

эозинофилами; встречаются гигантские клетки. В некротизированной ткани, а часто и в гигантских клетках обнаруживаются крупные ветвящиеся нити мицелия гриба.

Помимо изменений в дыхательном тракте, как и при аспергиллезе, наблюдаются поражения области глазной орбиты, придаточных пазух с последующим прорастанием гриба в полость черепа, что может вызвать поражения оболочек и вещества головного мозга (в полном смысле этого понятия – «человек проплесневел»). Развитие мукоромикотического менингита возможно и в результате занесения гриба при спинномозговой пункции. Описаны также мукорозные поражения желудка, кишечника («гастроинтестинальный мукороз»), почек. Прорастая стенки артерий, вен и лимфатических сосудов, мицелий гриба образует «сплетения» в их просвете, в результате чего развиваются тромбозы и инфаркты. При генерализации процесса течение заболевания принимает бурный характер и быстро заканчивается смертью. Метастатические очаги при генерализованном мукорозе обнаруживаются во внутренних органах и в головном мозгу.

К редким проявлениям относят мукороз кожи (с покраснением, уплотнением ее, некрозом и формированием язв с черными корками). Плесневые грибы могут осложнять различные травмы, раны, ожоговые поверхности, трофические язвы, что значительно отягощает их течение.

В срезах ткани возбудитель мукороза обнаруживается в виде несептированного широкого мицелия толщиной от 4 до 20 мкм. Иногда на концах мицелия видны шаровидные утолщения, заполненные спорами (спорангиями). При окраске срезов ткани гематоксилинэозином стенки мицелия и спор окрашиваются гематоксилином, а протоплазма – эозином. Более четко грибы контурируются при докраске фона тионином. Для окончательного диагноза необходимо микроскопическое изучение мазков-отпечатков и выделение гриба в чистой культуре. Тканевая реакция при

мукорозе сходна с изменениями при аспергиллезе. В отличие от аспергилл, мицелий мукоров значительно толще и не септирован. Однако, несмотря на эти различия, ведущая роль в идентификации мукорозных грибов принадлежит методу выделения их в чистой культуре. В ряде случаев поражения при мукорозе могут сочетаться с процессами, вызванными другими плесневыми или дрожжеподобными грибами.

2) Многоклеточные одноядерные грибы

Аспергилл (*Aspergillus* sp.)

Род аэробных плесневых грибов, включающий в себя несколько сотен видов. Мицелий у молодых грибов белого цвета. С возрастом окраска мицелия изменяется в зависимости от цвета спор.

Некоторые грибы из рода *Aspergillus*: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* – могут вызывать аспергиллезы – грибковые заболевания кожи, ногтей, слизистых оболочек, уха, глаза, легких и других внутренних органов. Заражение чаще всего происходит ингаляционным путем, через желудочно-кишечный тракт и нередко через поврежденную кожу. Инфицирование может происходить также от различных птиц (в том числе от домашних) и сельскохозяйственных животных. Чаще аспергиллез возникает при снижении сопротивляемости организма у людей, страдающих хроническими болезнями. На коже могут быть высыпания в виде дерматита, язвенных и абсцедирующих пиодермий, а также пузырьковая, узелковая сыпь или распространенная эритродермия. При поражении легких отмечается клиника бронхита, пневмонии и туберкулеза легких. Диагностика аспергиллеза осуществляется микроскопическими исследованиями (обнаружение спор и мицелия гриба в патологическом материале) и бактериологическими (выделение чистой культуры гриба).

Пеницилл (*Penicillium* sp.)

Один из наиболее широко распространённых в мире родов грибов, представители которого обнаруживаются в самых различных местах — в

почве, на растениях, в воздухе, в помещениях, на пищевых продуктах, в морях.

К роду относят продуцентов антибиотика пенициллина — среди них *P. chrysogenum*, являющийся одним из самых распространённых грибов в мире. Другой крайне широко распространённый вид рода — *P. citrinum*.

Гифы неправильно ветвящиеся, септированные, обычно неокрашенные. Конидиеносцы септированные, на конце несут так называемую кисточку (лат. *penicillus*) — мутовку фиалид (одноярусная кисточка) или мутовку метул, несущих по мутовке конидиогенных клеток каждая (двухъярусная кисточка). Сам конидиеносец может дополнительно ветвиться, в результате образуются трёх- и четырёхъярусные (иногда и с большим числом ярусов) кисточки. Большинство видов — исконно почвенные сапротрофы, меньшая доля — оппортунистические паразиты растений, поражающие ослабленные всходы и длительно хранящиеся плоды растений. Встречаются и на прочих органических субстратах, пищевых продуктах.

Среди видов рода известно множество продуцентов природных лекарственных препаратов, в том числе антибиотиков. Первый известный науке бактерицидный антибиотик — пенициллин, продуцируется пенициллами. Вещества группы пенициллинов обладают активностью по отношению к грамотрицательным и многим грамположительным бактериям, ингибируя синтез клеточной стенки.

Дрожжи

Это внетаксономическая группа одноклеточных грибов, утративших мицелиальное строение в связи с переходом к обитанию в жидких и полужидких средах. Объединяет около 1500 видов. Дрожжи относятся к царству грибов (*Mycota*), отделу истинных грибов (*Eumycota*). В зависимости от того, способны ли дрожжи размножаться половым путем, их можно

отнести к 2–м классам: классу аскомицетов и классу дейтеромицетов. Небольшая часть дрожжей относится к классу базидиомицетов.

Размножение дрожжей зависит от условий жизнедеятельности дрожжевой клетки и от вида дрожжей.

Вегетативное размножение происходит почкованием, реже – делением или почкующимся делением.

Почкование – это процесс образования на клетке маленького бугорка – почки, которая постепенно увеличивается в размерах. В месте соединения почки с материнской клеткой постепенно образуется сужение – перетяжка. Когда почка достигает примерно одной трети размеров материнской клетки, ядро перемещается в перетяжку и здесь происходит его деление на 2 ядра. Одно из ядер переходит в почку, а другое остается в материнской клетке. Постепенно перетяжка ограничивает дочернюю клетку от материнской, затем слои перегородки разделяются, оставляя на материнской клетке почковой рубец. Почкованием обычно размножаются дрожжи овальной формы.

Бинарное деление дрожжевой клетки происходит путем возникновения поперечной перегородки, которая, развиваясь, приводит к образованию двух дочерних клеток, идентичных родительской. Делением размножаются дрожжи цилиндрической формы.

Почкующееся деление характерно для дрожжей лимоновидной формы. Вначале на полюсе возникает почка, которая после деления ядра ограничивается от материнской клетки перегородкой.

Половое размножение

Этим способом размножаются некоторые виды гаплоидных дрожжей. Перед спорообразованием такие гаплоидные клетки сливаются, в результате образуется диплоидная клетка, ядро которой делится путем мейоза с

образованием четырех или восьми аскоспор. Половое размножение дрожжей осуществляется в неблагоприятных условиях.

Некоторые виды дрожжей с давних пор используются человеком при приготовлении хлеба, пива, вина, кваса и др. В сочетании с перегонкой процессы брожения лежат в основе производства крепких спиртных напитков. Высушенные пивные дрожжи используют для производства лекарственных препаратов и БАД. Также существует ряд препаратов на основе *Saccharomyces boulardii*, поддерживающих и восстанавливающих флору желудочно–кишечного тракта.

Некоторые виды дрожжей являются факультативными и условными патогенами, вызывая заболевания у людей с ослабленной иммунной системой.

Дрожжи рода *Candida* являются компонентами нормальной микрофлоры человека, однако при общем ослаблении организма травмами, ожогами, хирургическим вмешательством, длительном применении антибиотиков, в раннем детском возрасте и в старости и т. д. грибы рода *Candida* могут массово развиваться, вызывая заболевание — кандидоз — молочницу, которая поражает слизистые оболочки половых органов, рта, а иногда и внутренних органов. В нормальных условиях в человеческом организме дрожжи рода *Candida* ограничиваются в своём развитии естественной бактериальной микрофлорой человека (лактобактерии и пр.), но при развитии патологического процесса многие из них образуют высокопатогенные сообщества с бактериями.

Cryptococcus neoformans вызывает криптококкоз — инфекционное заболевание, характеризующееся поражением ЦНС лёгких, кожи, слизистых оболочек, особенно опасное для ВИЧ–инфицированных людей. Клетки *C. neoformans* окружены прочной полисахаридной капсулой, которая препятствует их распознаванию и уничтожению лейкоцитами. Дрожжи этого

вида наиболее часто обнаруживаются в помёте птиц, при том что сами птицы не болеют.

Род *Malassezia* включает облигатных симбионтов теплокровных животных и человека, не встречающихся нигде, кроме их кожных покровов. При нарушениях иммунитета вызывают педикулез (пёстрый лишай), фолликулит и себорейный дерматит. У здоровых людей при нормальном функционировании сальных желез *Malassezia* никак себя не проявляют и даже играют положительную роль, препятствуя развитию более опасных патогенов.

Задание:

- 1) Приготовить и микроскопировать препараты мицелиальных грибов: *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillum*.
- 2) Приготовить и микроскопировать препарат немикелиального гриба *Saccharomyces cerevisiae*.
- 3) Микроскопировать фиксированный препарат *Shizosaccharomyces ascospores*.

Тема 3. Морфология прокариот

Цели занятия:

- 1) Ознакомиться с морфологическими формами прокариот;
- 2) Приготовить и микроскопировать препараты кокков, одиночных палочек, нитчатых и извитых микроорганизмов.

Материалы и оборудование: микроскопы, предметные стекла, покровные стекла, промывалки с водой, микробиологические петли, спиртовки, спирт, спички, пробирки с кокками, культура сенной палочки, культура *Beggiatoa*, культура *Azospirillum*.

Прокариоты – одноклеточные организмы, имеющие недифференцированное ядро (нуклеоид). Размножаются простым бинарным (поперечным) делением клетки.

По форме клетки бактерии делят на 3 группы: шаровидные, палочковидные и извитые.

Шаровидные бактерии – кокки. Шаровидные бактерии не имеют жгутиков и не образуют спор. Направление плоскости деления клетки играет определяющую роль в образовании микроколоний. Выделяют следующие типы микроколоний:

Микрококки – Клетки делятся в одной плоскости, после деления располагаются одиночно (рис. 7).

Диплококки – после деления клетки располагаются попарно (рис. 7). Примерами диплококков могут служить грамотрицательные бактерии рода *Neisseria*: менингококк, гонококк, а также пневмококк.

Тетракокки – Клетки делятся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, образуются группы по 4 клетки (рис. 7).

Стрептококки – Клетки делятся в одной плоскости, после деления клетки остаются в цепочках (рис. 7). Стрептококки могут вызывать целый ряд заболеваний: рожа, скарлатина, ангина, бронхит, пневмония.

Сарцины – Клетки делятся в трёх взаимно перпендикулярных плоскостях, образуются пакеты по 8 или 64 клетки (рис. 7). Сарцины являются в основном сапрофитами, заболеваний у человека не вызывают.

Стафилококки – Клетки делятся в неопределённых направлениях, образуют скопление клеток, напоминающее виноградные грозди (рис. 7). Являются возбудителями гнойных заболеваний. Типовой представитель – *Staphylococcus aureus*.

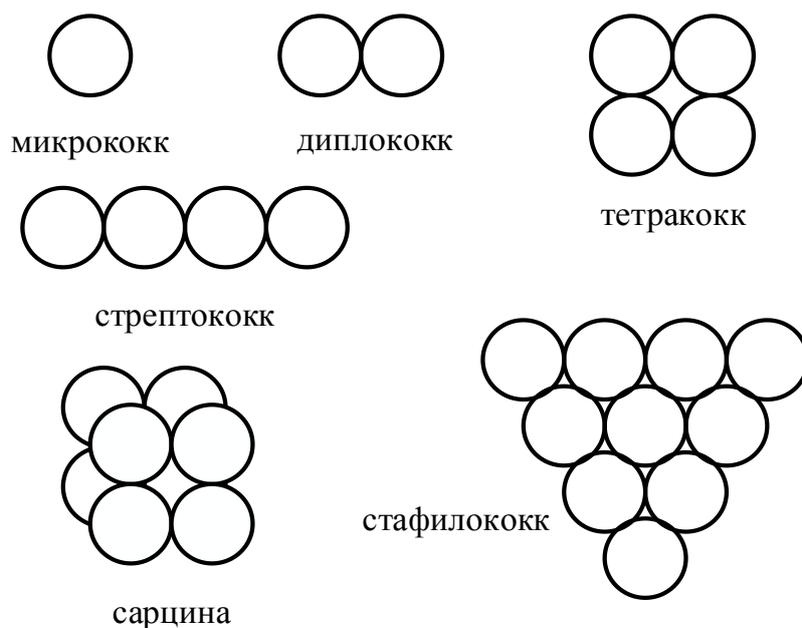


Рис. 7. Формы кокков

Палочковидные бактерии (бациллы) – это самая многочисленная и разнообразная группа бактерий. Длина клетки колеблется от десятых долей до 10 – 15 мкм и более, диаметр – от десятых долей до 2 мкм. Различаются морфологически по величине клетки, очертанию её концов, наличию или отсутствию жгутиков, а также по способности к спорообразованию. Палочковидные бактерии способны объединяться в цепочки. Если каждая клетка в цепочке имеет собственную оболочку, то это нитчатые организмы. Если же цепочка клеток окружена общей клеточной оболочкой, то это трихомный организм (рис. 8).

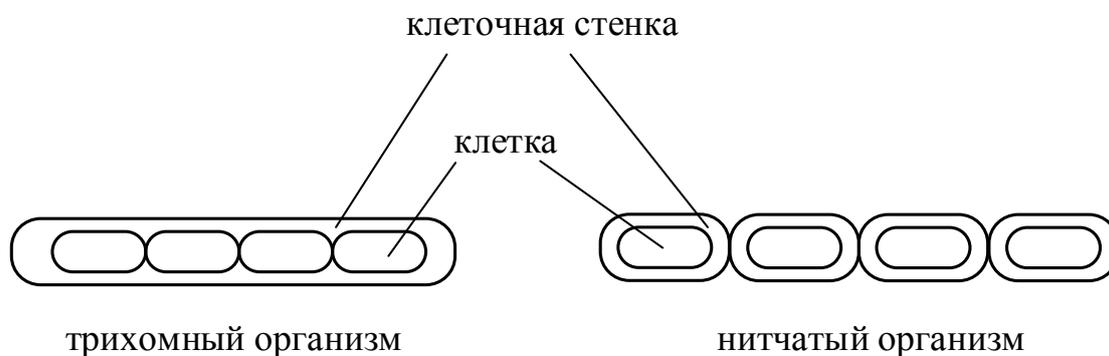


Рис. 8. Цепочки палочковидных клеток

Извитые бактерии – изогнутые палочки. Характер изогнутости клетки можно сравнивать с длиной волны. По степени изогнутости различают следующие формы:

Вибрионы – Короткие палочки, длиной 1–3 мкм, изогнуты на половину длины волны, напоминают по форме запятую (рис. 9). К ним относится холерный вибрион *Vibrio cholerae*

Спириллы – Палочки длиной 15–20 мкм, изогнуты на полную длину волны, напоминают растянутую латинскую букву S (рис. 9). Спириллы — сапрофиты; обитают в пресных и солёных водоёмах, встречаются также в загнивающей стоячей воде, навозной жиже и содержимом кишечника животных.

Спирохеты – Тонкие длинные клетки, 20 – 30 мкм, с большим числом изгибов напоминают растянутую спираль, обладают продольным делением клетки (рис. 9). Спирохеты вызывают у человека целый ряд заболеваний. Наиболее известным заболеванием является сифилис, вызываемым спирохетами вида *Treponema pallidum*. Еще одно серьезное заболевание, вызываемое другим видом спирохет *Borrelia burgdorferi* – это болезнь Лайма.

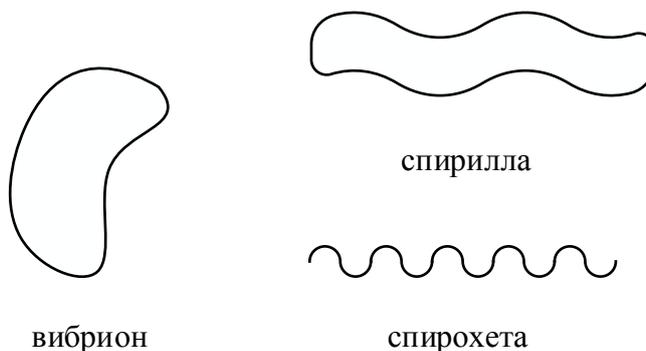


Рис. 9. Извитые формы бактерий

Задание:

- 1) Приготовить препарат кокков.
- 2) Приготовить препарат сенной палочки.

- 3) Приготовить препарат *Beggiatoa*.
- 4) Приготовить препарат спирилл.

Тема 4. Посев микроорганизмов из почвы, воды, воздуха

Цели занятия:

- 1) Ознакомиться с понятием и принципами определения микробной обсемененности;
- 2) Ознакомиться с типами питательных сред и методами стерилизации;
- 3) Провести посев микроорганизмов из почвы, воды и воздуха.

Материалы и оборудование: стерильные чашки Петри, стерильные пробирки, стерильные пипетки, спиртовки, спирт, спички, штативы, колбы с водой для разведений, пробирки с водой для разведений, пробирки с РПА, маркеры, водяная баня для пробирок.

Одним из санитарно–гигиенических показателей окружающей среды является микробная обсемененность, то есть количество содержащихся в субстрате микроорганизмов.

Микробную обсемененность объекта выражают в виде титра или индекса.

Титр — это наименьшее количество исследуемого субстрата, в котором обнаружен микроорганизм.

Индекс — количество клеток искомого микроорганизма, обнаруживаемого в определенном объеме исследуемого субстрата, например, в 1000 мл воды, в 1 г почвы, в 1 г пищевых продуктов.

Пересчет титра в индекс и обратно производят следующим образом:

$$\begin{aligned} \text{Титр} &= \frac{1000}{\text{индекс}}; & \text{индекс} &= \frac{1000}{\text{титр}}; \\ \text{Титр} &= \frac{1}{\text{индекс}}; & \text{индекс} &= \frac{1}{\text{титр}}. \end{aligned}$$

Принято считать, что чем выше общая **микробная обсемененность** объекта внешней среды, тем больше вероятность присутствия в них патогенных бактерий.

В санитарно–бактериологических лабораториях для количественного учета микроорганизмов применяют в основном прямой подсчет микроорганизмов и определение микробного числа. Реже используют титрационный посев (метод предельных разведений).

Прямой подсчет микроорганизмов. С помощью этого метода учитывают общее количество живых и мертвых клеток. Метод простой и доступный для использования в *санитарно–бактериологических лабораториях*, но имеет следующие недостатки. С помощью этого метода трудно различить микроорганизмы и инородные частицы, точно определить количество микроорганизмов, так как они часто образуют большие скопления, неразбивающиеся конгломераты (комочки), невозможно дифференцировать живые микроорганизмы и мертвые, хотя санитарное значение живых и мертвых бактерий неодинаково.

Микробное число. Этот метод позволяет учитывать только живые микроорганизмы. Микробным числом называют количество колоний, которые вырастают на мясопептонном агаре (МПА) при посеве 1 мл или 1 г субстрата и культивировании при 37°C в течение 24— 48 ч (или при 22°C 72 ч).

При определении микробного числа учитывают в основном колонии аэробных метатрофных (сапрофитных) мезофильных микробов, использующих в качестве источников азотного питания белок и продукты его распада. Эти микробы являются основными потребителями органических веществ, вносимых в почву и воду с различными отходами промышленных предприятий, выделениями людей и животных. Количество этих микроорганизмов, как правило, увеличивается в процессе загрязнения

внешней среды и уменьшается при ее самоочищении. Следовательно, бактериальное обсеменение субстрата, определяемое этим методом, оказывается значительно меньше, чем при прямом подсчете. Это объясняется также тем, что мертвые клетки при высеве не дадут роста на питательной среде; не растут живые клетки, утратившие способность к размножению; не всегда разбиваются бактериальные конгломераты и одна колония вырастает из нескольких клеток; отсутствуют питательные среды, обеспечивающие рост микроорганизмов всех видов; не вырастут анаэробы, так как культивирование проводят в аэробных условиях; не дадут роста термофилы и психрофилы (посевы выращивают при 37°C, т. е. при температуре, благоприятной для развития мезофильных микроорганизмов). Следовательно, количество микробов, вырастающих на МПА, оказывается во много раз меньше, чем их истинное содержание в высеваемом объекте.

Мы будем проводить учет микроорганизмов из разных субстратов путем посева на твердые питательные среды.

Типы питательных сред

Питательная среда – это однокомпонентный или многокомпонентный субстрат, применяемый для культивирования микроорганизмов. Она должна обладать следующими свойствами:

- 1) удовлетворять потребности микроорганизмов в питательных веществах;
- 2) быть изотоничной для микробной клетки; то есть осмотическое давление в среде должно быть таким же, как внутри клетки. Для большинства микроорганизмов оптимальная среда, соответствующая 0,5 % раствору натрия хлорида;
- 3) быть стерильной, так как посторонние микробы препятствуют росту изучаемого микроба, определению его свойств и изменяют свойства среды;

- 4) плотная среда должна быть влажной и иметь оптимальную для микроорганизмов консистенцию;
- 5) обладать определённым окислительно–восстановительным потенциалом, то есть соотношением веществ, отдающих и принимающих электроны, выражаемым индексом RH_2 ;
- 6) быть по возможности унифицированной, то есть содержать постоянное количество отдельных ингредиентов;
- 7) быть прозрачной, так как в прозрачном растворе легче заметить загрязнение другими микроорганизмами;
- 8) иметь определенный pH.

По агрегатному состоянию питательные среды делятся на жидкие, полужидкие и плотные. Жидкие среды представляют собой раствор питательных веществ в воде, в то время как в плотные и полужидкие добавляется загуститель. В качестве загустителя обычно используется желатин или агар–агар. Работать с плотными питательными средами можно, когда они находятся в расплавленном состоянии. Агар плавится при 85–95 °С, а застывает при 35–40 °С. Желатин же плавится при 32–35 °С, а застывает при 30 °С. Таким образом, у агара более широкий диапазон температур, при котором с ним можно работать, поэтому он намного чаще используется в микробиологии.

По составу питательные среды делятся на натуральные, полусинтетические и синтетические. *Натуральные* среды готовят из продуктов животного и растительного происхождения (мясо, асцит, костная мука, кормовые дрожжи, сгустки крови и др.). *Полусинтетические* среды – это среды, главными компонентами которых являются соединения известного химического состава – углеводы, соли аммония, фосфаты и т.д., а натуральные природные компоненты содержатся в небольших количествах. Это может быть дрожжевой автолизат, почвенный экстракт или гидролизаты

молока, казеина и т.п. *Синтетические* среды готовят из определённых химически чистых органических и неорганических соединений, взятых в точно указанных концентрациях и растворённых в дистиллированной воде. Для синтетических питательных сред точно известен состав, в то время как у натуральных и полусинтетических сред состав не полностью определен.

По консистенции питательные среды делятся на жидкие, сыпучие и твердые. Основу *сыпучих* сред составляют зерно, жмыхи, разваренное пшено, отруби и другие подобные вещества. Применяют их главным образом в промышленной микробиологии для культивирования некоторых продуцентов физиологически активных соединений, а также в коллекциях для сохранения культур микроорганизмов.

По применению питательные среды делятся на основные, специальные, транспортные, селективные и дифференциально-диагностические. Основные среды служат для культивирования большинства микроорганизмов, специальные – только для культивирования отдельных микроорганизмов, которые не растут на основных питательных средах. Транспортные среды используют для транспортировки микроорганизмов в коллекции или другие лаборатории. Они могут отличаться по составу от сред, на которых те же самые микроорганизмы культивируются в обычных условиях. Например, в лаборатории бактерий культивируют на жидкой среде, а транспортируют на твердой.

Селективные среды используют для получения накопительной культуры микроорганизмов. Это тип сред, в которых создаются условия для развития определенной физиологической группы микробов. Например, после кипячения уничтожаются все неспорообразующие бактерии, в присутствии кислорода не растут анаэробы, а при низких значениях pH развиваются только ацидофилы.

Дифференциально–диагностические среды позволяют отличить один вид микробов от другого по ферментативной активности. Дифференциально–диагностические среды особенно широко применяются в санитарной и медицинской микробиологии для быстрой идентификации определенных групп микроорганизмов.

Методы стерилизации

Стерилизация – полное освобождение какого–либо вещества или предмета от микроорганизмов путем воздействия на них физическими или химическими факторами. Все используемые для посева питательные среды, инструменты и посуда должны быть стерильны, чтобы не загрязнить исследуемый биоматериал посторонними бактериями. Существуют следующие методы стерилизации:

- термические (паровой, воздушный, гласперленовый);
- химические (газовый, растворы химических соединений);
- радиационный;
- плазменный и озоновый (группа хим. средств);
- метод мембранных фильтров: применяется для получения

небольшого количества стерильных растворов, качество которых может резко ухудшиться при действии других методов стерилизации

Паровая стерилизация осуществляется подачей насыщенного водяного пара под давлением в паровых стерилизаторах (автоклавах). Такая методика считается наиболее эффективным методом, так как чем выше давление, тем выше температура пара, стерилизующего материал.

Паровой стерилизации подвергают изделия из текстиля (бельё, вату, бинты, шовный материал), из резины, стекла, некоторых полимерных материалов, питательные среды, лекарственные препараты.

В настоящее время паровая стерилизация продолжает оставаться самым распространенным в мире способом стерилизации. Данный метод

высокоэффективен, экономичен и приемлем для многих медицинских изделий.

Для *газовой (холодной)* стерилизации используют герметичные контейнеры или специальные аппараты с камерами, заполняемыми парами окиси этилена, формальдегида или специализированными многокомпонентными системами. Используются при обработке приборов, аппаратов, сложных оптических систем, крупногабаритных изделий или изделий из титана, полимерных смол, резин.

Для *химической* стерилизации растворами применяются четыре основных группы веществ:

Кислота+окислитель (например, «Первомур»)

Альдегид (например, формалин)

Детергент (например, хлоргексидина биглюконат)

Галоид (например, Повидон–йод)

Концентрация стерилизанта и время экспозиции зависит от используемого химического вещества.

Наиболее широко в мире применяется стерилизация с помощью этиленоксида.

Этиленоксидная стерилизация прекрасно зарекомендовала себя в большинстве стран мира, оборудование для ее проведения выпускается большим количеством производителей в различных странах Европы и Америки. Этиленоксидный метод обеспечивает самый щадящий температурный режим стерилизации.

Формальдегид нашел широкое применение в качестве стерилизанта высокого уровня с использованием специальных камер. Для стерилизации же он не является самым удачным выбором. Низкая проникающая способность формальдегида приводит к тому, что данный метод требует применения рабочей температуры в пределах 65 – 80°C, и многие специалисты вообще не

считают этот метод низкотемпературным. Для формальдегида имеются существенные ограничения в отношении стерилизации полых изделий, изделий с отверстиями и каналами. Весьма существенно, что для формальдегида не разработано нейтрализаторов и полного мониторинга процесса стерилизации. Химические методы стерилизации показали себя надежными и эффективными методами. Однако и они не лишены определенных недостатков. В первую очередь, к ним следует отнести высокую токсичность используемых стерилизантов, что требует выполнения очистки стерилизуемого оборудования и материалов от остатков стерилизационного агента, сохраняющихся на поверхности и в порах материала после цикла стерилизации. Также необходимо учесть тот факт, что не все материалы, используемые для производства медицинских изделий, выдерживают химическое воздействие стерилизантов.

Радиационный метод (лучевую стерилизацию γ -лучами) применяют в специальных установках при промышленной стерилизации однократного применения – полимерных шприцев, систем переливания крови, чашек Петри, пипеток и других хрупких и термолабильных изделий.

Некоторое время в фармтехнологии для стерилизации используется ультрафиолетовое (УФ) (длина волны 253,7 нм). Источником УФ-излучения являются ртутные кварцевые лампы. Их мощное бактериостатическое действие основано на совпадении спектра испускания лампы и спектра поглощения ДНК микроорганизмов, что является причиной их гибели при длительной обработке излучением кварцевых ламп. При недостаточно мощном действии УФ в клетках микроорганизмов активизируются процессы репарации и клетка может восстановиться. Метод применяется для стерилизации воздуха приточно–вытяжной вентиляции, оборудования в биксах, также для стерилизации дистиллированной воды. Радиационная стерилизация – эффективный метод стерилизации, подходящий для многих

инструментов, имплантатов и материалов. Его промышленные применения для стерилизации одноразовых медицинских инструментов и материалов является наиболее оправданным. Однако, подобные установки не используются в отделениях стерилизации ЛПУ, следовательно, не могут обеспечивать рутинную обработку многоразовых инструментов и материалов.

Метод *плазменной стерилизации* основан на действии плазмы перекиси водорода (H_2O_2). Она состоит из ионов, электронов, нейтральных атомов и молекул и образуется под действием внешних источников энергии, таких как температура, радиационное излучение, электрическое поле и др. При этом методе после впрыскивания раствора перекиси водорода в стерилизационную камеру включается источник электромагнитного излучения, под воздействием которого одновременно происходит деление одной части молекул H_2O_2 на две группы (OH^-), а другой части – на одну гидропероксильную группу (OOH^-) и один атом водорода, сопровождающееся выделением видимого и ультрафиолетового излучения. В результате создается биоцидная среда, состоящая из молекул перекиси водорода, свободных радикалов и ультрафиолетового излучения. При отключении электромагнитного поля свободные радикалы преобразуются в молекулы воды и кислорода, не оставляя никаких токсичных отходов.

Плазменная стерилизация является единственным экономически эффективным методом стерилизации медицинских изделий из материалов, чувствительных к действию высокой температуры и влаги, а также инструментов и изделий, содержащих узкие, с трудом поддающиеся стерилизации каналы, которые могут стать входными воротами для инфицирования больного в стационаре. В плазменном стерилизаторе допускается обрабатывать практически всю номенклатуру применяемых в ЛПУ медицинских изделий. К ним относятся изделия из полимеров,

электроинструменты и кабели, оптоволоконные световодные системы, электронные устройства, электрофизиологические катетеры, изделия из оптического стекла, металлические инструменты для микрохирургии и многое другое.

Посев микроорганизмов из почвы

В почве обитает огромное количество микроорганизмов, и если сразу высеять почву на питательную среду, получится сплошной бактериальный газон, где невозможно будет подсчитать количество колоний. Поэтому перед посевом готовят ряд разведений.

1. Взвешивают 1 г почвы.
2. Готовят первое разведение. Стерильно в пламени спиртовки помещают навеску в колбу с 99 мл стерильной водопроводной воды. Получается разведение в 100 раз.
3. Готовят второе разведение. Тщательно перемешивают содержимое колбы, отбирают пипеткой 1 мл раствора и переносят во вторую колбу, содержащую 99 мл стерильной водопроводной воды. Получается разведение в 10000 раз.
4. В чашку Петри стерильно наливают расплавленную стерильную питательную среду. Предварительно проверяют температуру среды: если терпит щека, то на такую среду можно высевать бактерий.
5. Тщательно перемешивают содержимое колбы со вторым разведением. Стерильно пипеткой отбирают 1 мл жидкости и переносят его в чашку Петри. Перемешивают со средой, не отрывая чашку Петри от поверхности стола.

Посев микроорганизмов из водопроводной воды

1. Прокаливают кран в пламени спиртовки.
2. Открывают кран и в течение 10 минут спускают воду, чтобы смыть микробов, скопившихся в трубах.
3. Отбирают воду в стерильную пробирку.

4. В чашку Петри стерильно помещают расплавленную питательную среду и вносят пипеткой 1 мл отобранной водопроводной воды.

Посев микроорганизмов из стоячей воды.

1. Готовят первое разведение. Отбирают пипеткой 1 мл стоячей воды и стерильно переносят ее в пробирку, содержащую 9 мл стерильной водопроводной воды. Получают разведение в 10 раз.

2. Готовят второе разведение. Стерильно пипеткой отбирают 1 мл воды из пробирки с первым разведением и переносят ее во вторую пробирку с 9 мл стерильной водопроводной воды. Получают разведение в 100 раз.

3. В чашку Петри стерильно помещают расплавленную питательную среду и вносят пипеткой 1 мл воды из второго разведения.

Посев микроорганизмов из воздуха

1. В чашку Петри стерильно помещают расплавленную питательную среду.

2. Открывают чашку Петри и оставляют на 5 мин в помещении вдали с закрытыми окнами и дверями, чтобы отсутствовало движение воздуха.

3. Через 5 мин закрывают чашку Петри.

Задание:

1) Осуществить посев микроорганизмов из водопроводной воды.

2) Осуществить посев микроорганизмов из стоячей воды.

3) Осуществить посев микроорганизмов из почвы.

4) Осуществить посев микроорганизмов из воздуха.

Тема 5. Учет микроорганизмов в посевах. Выделение в чистую культуру

Цели занятия:

- 1) Провести учет микроорганизмов в посевах из почвы, воды и воздуха;
- 2) Проверить соответствие полученных результатов санитарным нормам;
- 3) Выделить чистую культуру из колонии микроорганизмов;
- 4) Провести характеристику данной колонии.

Материалы и оборудование: чашки Петри с посевами с прошлого занятия, пробирки со стерильными средами Гисса с сахарозой, средами Гисса с мальтозой, КПА (скошенный агар), РПА, спиртовки, спирт, спички, микробиологические петли, микробиологические иглы, маркеры, бумажные колпачки, баночки для пробирок, штативы.

Учет микроорганизмов в посевах проводится на следующем занятии. Подсчитывается количество колоний, выросших на чашке Петри. Поскольку каждая колония – это потомки одной клетки, по числу колоний можно судить о числе живых микроорганизмов в субстрате.

При подсчете колоний чашку Петри переворачивают кверху дном и каждую посчитанную колонию отмечают маркером, чтобы не запутаться. В случае, если колоний на чашке очень много, чашку делят на сектора, считают колонии в одном секторе и полученное число умножают на количество секторов.

Учет микроорганизмов в посевах водопроводной воды.

Считают количество выросших на чашке колоний. Полученное число – количество клеток в 1 мл водопроводной воды. В соответствии с ГОСТ 2874–73 общее число бактерий в 1 мл питьевой водопроводной воды должно быть не более 100. Для колодцев и открытых водоемов допускается до 1000.

Учет микроорганизмов в посевах стоячей воды.

Считают количество выросших на чашке колоний и умножают на разведение. Полученное число – количество клеток в 1 мл стоячей воды.

Учет микроорганизмов в посевах почвы.

Считают количество выросших на чашке колоний и умножают на разведение. Полученное число – количество клеток в 1 г почвы.

Учет микроорганизмов в посевах из воздуха.

Считают количество выросших на чашке колоний. Согласно правилу Омелянского, за 5 минут на площади 100 см² оседают микроорганизмы из 10

л воздуха. Рассчитывают площадь дна чашки Петри, по пропорции определяют, из какого объема воздуха осели микроорганизмы и делают пересчет на 1 м³.

Пример расчета: На чашке Петри площадью 56 см² выросло 150 колоний микроорганизмов. Узнаем, сколько микроорганизмов выросло бы на площади 100 см² с помощью пропорции:

$$\begin{array}{l} 56—150 \\ 100—x \\ x = (100 \cdot 150) / 56 = 267 \end{array}$$

Следовательно, на чашке Петри площадью 100 см² выросло 267 микроорганизмов. Далее делаем перерасчет на 1 м³.

$$\begin{array}{l} 10 \text{ л} — 267 \\ 1000 — x \\ x = (1000 \cdot 267) / 10 = 26700 \end{array}$$

Таким образом, в 1 м³ воздуха содержится 26 700 микроорганизмов.

Полученные результаты сопоставляют с критериями для оценки воздуха жилых помещений по числу микроорганизмов в 1 м³ воздуха, приведенными в таблице 1.

Таблица 1. Критерии для оценки воздуха жилых помещений по числу микроорганизмов в 1 м³ воздуха

Оценка воздуха	Летом в 1 м ³	Зимой в 1 м ³
Чистый	До 1500	4300
Грязный	До 2500	7000

Характеристика колонии

Для характеристики колонии оценивают следующие показатели:

1. Размер колонии (диаметр).

2. Форма колонии (круглая, овальная, звездчатая, амeboидная, ризоидная).
3. Край колонии (ровный, фестончатый, волнистый, эрозированный или зазубренный, бахромчатый).
4. Рельеф (профиль) колонии (куполообразный, плосковыпуклый, конусообразный, плоский, с приподнятой в виде соска серединой и валиком по периферии, с вдавленным центром).
5. Поверхность колонии (гладкая или шероховатая).
6. Блеск колонии (матовая, глянцевая).
7. Цвет колонии (белый, желтый, оранжевый, розовый).
8. Консистенция колоний (пастообразная, вязкая, волокнистая, сухая).

Выделение чистой культуры

Чистая культура – это культура, состоящая из бактерий одного вида. Идентификация любых бактерий с использованием метода посева на питательные среды невозможна без выделения чистой культуры. Это требование в микробиологии связано с тем, что присутствие микробов других родов и семейств во время проведения бактериологических исследований всегда существенно искажает результаты, вследствие чего исследователь делает неверные заключения.

Для выделения чистой культуры выбирают колонию диаметром около 1 см, растущую обособленно от других колоний. Из нее производят посев на различные питательные среды.

Посев штрихом

Осуществляют микробиологической петлей на пробирку со скошенным агаром. Стерилизуют микробиологическую петлю в пламени спиртовки. Приоткрывают крышку чашки Петри, охлаждают раскаленную петлю в агаре и отбирают микробов из исследуемой колонии. Закрывают чашку Петри, стерильно в пламени открывают пробирку со скошенным

агаром, проводят микробиологической петлей по поверхности агара, закрывают пробирку.

Посев уколом

Осуществляют микробиологической иглой на пробирку со столбиком плотной питательной среды. Стерилизуют микробиологическую иглу в пламени спиртовки. Приоткрывают крышку чашки Петри, охлаждают раскаленную иглу в агаре и отбирают микробов из исследуемой колонии. Закрывают чашку Петри, берут пробирку с питательной средой доньшком вверх, стерильно в пламени открывают, вкалывают микробиологическую иглу до дна пробирки, закрывают пробирку.

Задание:

- 1) Провести учет микроорганизмов в посевах из почвы, воды и воздуха.
- 2) Выделить чистую культуру.

Тема 6. Идентификация бактерий – определение бактерий до рода.

Окраска по Граму

Цели занятия:

- 1) Изучить морфологические свойства культуры бактерий;
- 2) Проверить характер роста на средах Гисса, РПА и КПА;
- 3) Провести окраску по Граму;
- 4) Провести реакцию на обнаружение каталазы;
- 5) Сделать вывод о родовой принадлежности исследуемой бактерии.

Материалы и оборудование: пробирки с бактериями с прошлого занятия, штативы, микроскопы, предметные стекла, покровные стекла, спиртовки, спирт, микробиологические петли, промывалки с водой, маркеры, гемцианвиолет, раствор Люголя, фуксин, ванночки с мостиками, перексид водорода.

В настоящее время для идентификации бактерий используется полифазный анализ – проверка морфологических, культуральных,

тинкториальных, биохимических и молекулярно–генетических свойств. Часто для идентификации бактерий до рода бывает достаточно проверить только некоторые свойства из этого списка.

Морфологические свойства

Для изучения морфологии клеток используют световой микроскоп. Проверяют форму клеток (кокки, палочки, извитые), подвижность, наличие или отсутствие спор.

Культуральные свойства

Для проверки культуральных свойств бактерии культивируют на различных стандартных средах.

Рост на средах Гисса

Среды Гисса («пестрый ряд») — это дифференциально – диагностические среды, используемые для выявления сахаролитической активности бактерий. В состав среды входит какой–либо углевод (сахароза, мальтоза, галактоза...) и индикатор рН. Если на среде Гисса наблюдается рост, значит бактерии могут использовать входящий в ее состав углевод в качестве источника углерода. Если происходит подкисление среды и изменяется цвет индикатора, значит углевод утилизируется за счет брожения. Если же при росте бактерий цвет среды не изменяется, значит углевод утилизируется за счет дыхания.

Рост на столбике РПА

По характеру роста бактерий после посева уколом на столбик РПА судят об их отношении к кислороду. Если рост наблюдается на дне пробирки, то исследуемые бактерии – анаэробы, если по всему уколу – факультативные анаэробы, если на поверхности столбика – аэробы.

Рост на КПА (крахмало–пептонный агар)

Применяется для выявления способности испытуемого микроорганизма синтезировать амилазу для использования крахмала как

источника углерода и энергии. На скошенный агар с добавлением 1% пептона и 1–2% крахмала засевают штрихом исследуемую культуру. Просветление среды вокруг микробных колоний, свидетельствует о гидролизе крахмала. Для получения более четко выраженных результатов реакции пользуются раствором Люголя. При добавлении нескольких миллилитров этого раствора фон среды окрашивается в синий цвет, кроме зон, в которых произошел гидролиз крахмала. При полном гидролизе среда становится прозрачной, в зонах, где крахмал гидролизует до декстрина, она приобретает красно–бурый цвет.

Тинкториальные свойства

Окраска по Граму

Окрашивание по Граму широко распространено в микробиологии, так как это один из самых простых способов дифференциации бактерий в зависимости от состава их клеточной стенки. У грамположительных бактерий в составе клеточной стенки имеется мощный пептидогликановый слой (15–80 нм), в то время как у грамотрицательных бактерий толщина пептидогликанового слоя значительно меньше (2–8 нм). Суть окрашивания по Граму заключается в том, что фиксированный препарат окрашивается гемцианвиолетом, который затем вымывается спиртом. В случае грамположительных бактерий краситель связывается с толстым пептидогликановым слоем и клетки приобретают синий цвет. Тонкая стенка грамотрицательных бактерий не может задержать краситель, и он вымывается спиртом. Поэтому клетки приобретают красный цвет.

К грамотрицательным относятся цианобактерии, серобактерии, железобактерии, хламидии, риккетсии, укусные бактерии, многие метиловобактерии, тионовые бактерии, арсениобактерии, карбоксидобактерии. Грамположительными являются бифидобактерии, многие водные бактерии, стрептококки и стафилококки.

Ход работы:

1. Приготовить мазок.
2. Зафиксировать в пламени горелки.
3. Нанести первый краситель – гемциан–виолет. Выдержать 4–5 мин.
4. Не промывая мазок, нанести несколько капель раствора Люголя. Выдержать до 1 мин (препарат должен потемнеть, но не почернеть).
5. Раствор Люголя слить.
6. Препараты опустить в ванночку с 96⁰ этиловым спиртом на 45 сек.
7. Препарат промыть до «чистой воды»
8. Нанести второй краситель – фуксин – на 1–2 мин.
9. Препараты промыть и подсушить.
10. Грамположительные бактерии – сине–фиолетовая окраска (1–й краситель). Грамотрицательные бактерии – красно–розовая окраска (2–й краситель).

Существуют различные модификации дифференциального метода окраски клеточных стенок бактерий. Их целью является «более точная идентификация» типа клеточной стенки в специальных случаях (например, для отдельных видов микроорганизмов). Чаще всего вместо фуксина в качестве второго красителя используют сафранин, при этом клетки грамотрицательных бактерий окрашиваются в оранжево–розовый цвет, что позволяет четче их различить.

Грамположительные микро– или диплококки – семейство *Streptococcaceae*.

Грамположительные тетракокки – семейство *Micrococcaceae*.

Грамотрицательные палочки без спор – род *Pseudomonas*.

Грамположительные палочки без спор – семейство *Lactobacillaceae*.

Грамположительные палочки со спорами – семейство *Bacillaceae*.

Биохимические свойства

Обнаружение каталазы. На предметное стекло наносят каплю 1—3 % раствора пероксида водорода и вносят в нее петлю с бактериальной

культурой. Каталаза разлагает пероксид водорода на кислород и воду. Выделение пузырьков газа свидетельствует о наличии у данного вида бактерий каталазы.

Задание:

- 1) Микроскопировать выросшие бактерии.
- 2) Оценить рост бактерий на средах Гисса, РПА и КПА.
- 3) Провести реакцию на каталазу.
- 4) Провести окрашивание по Граму.
- 5) Заполнить таблицу 2.

Таблица 2. Характеристика бактериальной культуры

Рост бактерий на средах				Морфология клеток	Наличие спор	каталаза	Окраска по Граму
Среда Гисса с мальтозой	Среда Гисса с сахарозой	РПА	КПА				

- б) Сделать вывод о родовой принадлежности бактерий.

Тема 7. Окрашивание спор и жгутиков

Цели занятия:

- 1) Ознакомиться с методами окрашивания спор и жгутиков;
- 2) Провести окраску спор по Ожешко;
- 3) Провести проверку кислотоустойчивости путем окраски по Цилю–Нильсену;
- 4) Провести окраску спор по Шефферу–Фултону;
- 5) Провести окраску жгутиков по Хью–Лейфсону.

Материалы и оборудование: культура сенной палочки, культура *Spirillum winogradskii* на скошенном агаре, микроскопы, предметные стекла, спиртовки, спирт, микробиологические петли, промывалки с водой,

фильтровальная бумага, маркеры, 0,5% раствор соляной кислоты, карболовый фуксин Циля, ванночка с 5% серной кислотой, метиленовый синий, 0,5% водный раствор малахитового зеленого, 0,5 % раствор сафранина, стерильная забуференная дистиллированная вода, краситель Лейфсона.

Наличие спор и жгутиков – один из диагностических признаков для определения бактерий.

В качестве объекта для окрашивания спор используется сенная палочка, для окрашивания жгутиков – *Spirillum winogradskii*, для выявления кислотоустойчивости – сенная палочка или дрожжи.

Окраска спор по Ожешко

Приготовить стандартный мазок (толстый, у одного края стекла). На высушенный нефиксированный препарат нанести несколько капель 0,5% раствора соляной кислоты и подогреть 1–2 мин над пламенем горелки до закипания. Остаток кислоты слить. Дать стеклу остыть. Промыть. Подсушить и зафиксировать в пламени горелки. Окрасить карболовым фуксином Циля с подогреванием до появления паров. Затем стекла охладить и поместить в ванночку с 5% серной кислотой для обесцвечивания на несколько секунд. Промыть водой, высушить. Покрасить препарат метиленовым синим 1–2 минуты, промыть водой, высушить. Споры окрашиваются в красно–розовый цвет, клетки – в синий.

Выявление кислотоустойчивых бактерий.

Окраска по Цилю–Нильсену

Приготовить стандартный мазок (у одного края стекла). Зафиксировать в пламени горелки. Нанести карболовый фуксин Циля и подогреть стекло над пламенем горелки до появления паров, но не до кипения красителя. Дать препарату остыть. Промыть. Препарат поместить в ванночку с 5% серной кислотой или 96⁰ этиловым спиртом с 3% соляной кислоты по объему.

Длительность обесцвечивания 3–5 с. При этом препарат несколько раз погружают в раствор и вынимают. Препарат тщательно промыть водой, высушить. Покрасить препарат метиленовым синим 3–5 минут, промыть водой, высушить. Кислотоустойчивые бактерии окрашиваются в ярко-красный цвет, а некислотоустойчивые приобретают цвет второго красителя (синий).

Окраска по Цилю–Нильсену является одним из методов выявления возбудителей туберкулеза и проказы.

Методика окраски спор по Шефферу–Фултону

Фиксированный мазок покрыть кусочком фильтровальной бумаги, на который нанести 0,5% водный раствор малахитового зеленого и 2–3 раза нагреть в пламени спиртовки до появления паров. Фильтровальную бумагу снять, препарат промыть водой в течение 30 с и докрасить 0,5 % раствором сафранина. Препарат промыть водой, высушить фильтровальной бумагой. Споры окрашиваются в зеленый цвет, клетка – в красный.

Выявление жгутиков окраской по Хью–Лейфсону

Для окраски жгутиков используют клетки, выращенные на поверхности скошенного агара. Бактериальной петлей отбирают клетки, находящиеся у конденсационной воды. Полпетли культуры микроорганизмов осторожно перенести в стерильную забуференную дистиллированную воду, при этом температура воды должна быть такой же, как и температура инкубирования бактерий на скошенном агаре. Бактерии с петли не стряхивать, а петлю осторожно погружать в воду и ждать, пока культура «разойдется». Пробирку с бактериями оставить при комнатной температуре на 30 мин. Использовать химически чистое (вымытое в хромовой смеси) стекло, на которое нанести 2–3 капли суспензии микроорганизмов. Суспензию распределить по поверхности стекла, осторожно его наклоняя. Высушить на воздухе и на 30 мин залить

красителем Лейфсона. *Краситель Лейфсона*: 1,5% раствор хлористого натрия, 1,2% раствор основного фуксина, 3% раствор таниновой кислоты. Все растворы готовят отдельно и смешивают в равных соотношениях только перед употреблением. Затем препарат тщательно промыть водой, высушить и микроскопировать с иммерсией. Жгутики имеют вид темно-красных прямых образований.

Задание:

- 1) Провести окраску спор сенной палочки по Ожешко.
- 2) Провести окраску сенной палочки и дрожжей по Цилю–Нильсену.
- 3) Провести окраску сенной палочки по Шефферу–Фултону.
- 4) Провести окраску *Spirillum winogradskii* по Хью–Лейфсону.

Тема 8. Азотфиксация. Аммонификация

Цели занятия:

- 1) Ознакомиться с процессами азотфиксации и аммонификации, а также с представителями азотфиксирующих и аммонифицирующих бактерий;
- 2) Приготовить препарат *Rhizobium*;
- 3) Приготовить препарат *Azotobacter*;
- 4) Провести выявление аммонифицирующей активности бактерий.

Материалы и оборудование: микроскопы, предметные стекла, покровные стекла, пинцет, микробиологические петли, клубеньки сои, метиленовый синий, культура *Azotobacter*, тушь, карболовый раствор фуксина, культура уробактерий, реактив Несслера, чашка Петри, пипетка, лакмусовая бумажка.

Для конструктивного метаболизма живые организмы нуждаются не только в источниках углерода, но и в источниках азота. Прокариоты могут использовать в качестве источников азота молекулярный азот, а также органические и неорганические азотсодержащие соединения. Использование

бактериями молекулярного азота носит название *азотфиксация*, а азота органических соединений – *аммонификация*.

Азотфиксация

К азотфиксации или diazotрофии способны только прокариоты. Это важный этап круговорота азота, возвращающий в почву молекулярный азот из атмосферы. Молекула азота состоит из двух атомов, соединенных тройной связью. Разрыв связи идет в три этапа с затратой большого количества энергии (940 кДж/моль).

Реакция азотфиксации катализируется нитрогеназным комплексом, включающем в себе более 20 субъединиц. Каталитическая субъединица кодируется геном *nifH*. Присутствие этого гена в организме является маркером азотфиксации.

К азотфиксаторам относятся свободноживущие и симбиотические микроорганизмы. Классическим примером симбиотических азотфиксаторов являются клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*, образующие симбиоз с корнями бобовых растений. Клубеньковые бактерии обладают избирательной способностью вступать в симбиотические взаимоотношения с различными бобовыми растениями. На основании специфичности симбиоза все клубеньковые бактерии делят на виды: бактерии гороха – *Rhizobium leguminosarum*, донника и люцерны – *Rh. meliloti*; клевера – *Rh. trifolii*; фасоли – *Rh. phaseoli*; люпина – *Rh. lupini*; сои – *Rh. japonicum* и др.

Клубеньковые бактерии отдельных видов имеют некоторые разнообразия морфологических форм. Так, *Rh. trifolii* – толстые и короткие (до 2 мкм), покрытые слизью палочки; *Rh. leguminosarum* – палочки длиной 3,5–4 мкм; *Rh. lupini* – сильно изогнутые, крупные, покрытые слизью палочки.

Неодинаковые у бобовых растений и формы, и размеры клубеньков, а также расположение их на корнях. У одних бобовых растений (горох, клевер,

вика) клубеньки образуются в виде небольших вздутых на различных разветвлениях корней; у других (люпина) – имеют вид крупных бородавчатых наростов на главном корне.

Клубеньковые бактерии имеют очень большое сельскохозяйственное значение, так как, усваивая азот из воздуха, они способствуют повышению урожайности сельскохозяйственных и особенно бобовых культур.

Еще один пример симбиотических азотфиксаторов – это актиномицеты рода *Frankia*, образующие симбиоз с растениями из семейства Лоховые (*Elaeagnaceae*): облепиха (*Hippophae*), лох (*Elaeagnus*), восковница (*Myrica*).

Третий пример симбиоза растений с diaзотрофами – это симбиоз цианобактерий с папоротниками или мхами. Симбиотический комплекс водного папоротника *Azolla* и цианобактерии *Anabaena* имеет большое сельскохозяйственное значение: заселение рисовых плантаций этим папоротником резко повышает урожайность риса.

К азотфиксации способны и очень многие свободноживущие почвенные бактерии: *Azotobacter*, *Clostridium*, *Beijerinckia*, *Bacillus*, *Desulfovibrio*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Hydrogenomonas*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Spirillum*, *Deria*. Самые распространенные и изученные среди них – анаэробные бактерии рода *Clostridium* и аэробы *Azotobacter* и *Beijerinckia*.

Azotobacter – аэробная неспорообразующая грамотрицательная бактерия. Культуры азотобактера в лабораторных условиях отличаются полиморфизмом. Молодые клетки подвижны; они имеют многочисленные или единичные жгутики. В старых культурах клетки азотобактера покрываются плотной слизистой оболочкой (капсулой), образуя цисты. Они могут прорасти, давая начало молодым клеткам.

Clostridium — грамположительные, облигатно анаэробные палочковидные бактерии, способных продуцировать эндоспоры. Род

включает как свободно живущие виды (например, *Clostridium pasteurianum*), так и патогенные, например, возбудители столбняка (*Clostridium tetani*), газовой гангрены (*Clostridium perfringens*) и ботулизма (*Clostridium botulinum*).

Приготовление препарата *Rhizobium*

Раздавить пинцетом клубенек с корней сои и нанести выделившийся сок на предметное стекло. Окрасить метиленовым синим, накрыть покровным стеклом и микроскопировать.

Приготовление препарата *Azotobacter*

На середину предметного стекла наносят капельку туши и смешивают ее петлей с каплей культуры. Делают мазок ребром покровного стекла, дают высохнуть и микроскопируют. На черном фоне видны неокрашенные микробы, капсулы.

Мазок, окрашенный тушью, фиксируют в пламени спиртовки. После промывания водой красят 5–10 мин карболовым раствором фуксина и вновь промывают, а затем высушивают. На черном фоне видны красные или фиолетовые бактерии и неокрашенные капсулы.

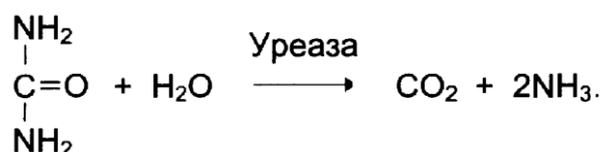
Аммонификация

Аммонификация – распад азотсодержащих органических соединений с высвобождением NH_3 . Аммонификации могут подвергаться белки, аминокислоты, нуклеиновые кислоты, мочевая кислота, мочевины, хитин. В процессе аммонификации трудноусвояемый азот органических соединений почвы (гумуса, органических удобрений, растительных остатков, отмерших тел животных и микроорганизмов) переходит в доступную для растений форму. Аммонификация белков осуществляется широко распространёнными в почве гнилостными бактериями, а также некоторыми актиномицетами и грибами. Выделяющийся при аммонификации аммиак частично используется самими микроорганизмами, а большая часть его

нейтрализуется в почве органическими и неорганическими кислотами с образованием аммонийных солей.

В процессе гниения участвуют аэробные бактерии – *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *Serratia marcescens*, бактерии рода *Proteus*; грибы рода *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*; анаэробы – *C. sporogenes*, *C. putrificum*; уробактерии – *Urobacillus pasteuri*, *Sarcina ureae*, расщепляющие мочевины.

Расщепление мочевины осуществляется в соответствии со следующим уравнением:



Выявление аммонифицирующих бактерий осуществляют посевом из соответствующего разведения (четыре–пять) на мясо–пептонном агаре (МПА), мясо–пептонном бульоне (МПБ) или пептонной воде. О развитии аммонифицирующих бактерий судят по помутнению среды и появлению на поверхности пленки.

В целях более точной оценки аммонифицирующей активности бактерий анализируют выделение аммиака (NH_3). Аммиак выявляют в атмосфере и субстрате. Выделяющийся NH_3 окрашивает подвешенную в пробирке красную лакмусовую бумажку в синий цвет. Накопление NH_3 в субстрате устанавливают при помощи реактива Несслера. На фарфоровую пластинку с лунками или предметное стекло помещают каплю субстрата, затем вносят каплю реактива Несслера. При большом количестве NH_3 образуется коричневый или буроватый осадок, при небольшом – оранжевая или желтая окраска.

Бактерии, способные к аммонификации мочевины, – уробактерии, выявляют по выделению аммиака на средах, содержащих мочевины, среде Федорова, среде Зенгена.

Среда Федорова

Состав (в граммах на 1 л дистиллированной воды): К или Na – виннокислый или Na яблочнокислый – 5,0; мочевины – 50,0; K_2HPO_4 – 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2.

В термостойкую плоскодонную либо коническую колбу помещают 1 л водопроводной воды. Вносят соли, кроме мочевины. Среду стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С, давлении 101,3 кПа в течение 20 мин. В стерильную среду добавляют раствор мочевины, предварительно пропущенный через бактериальный фильтр. Среду разливают по 30 мл в конические колбы.

Срок хранения среды – не более 3 мес; в холодильнике – не более 7 дней.

Среда Зенгена

Состав (в граммах на 1 л водопроводной воды): мочевины – 30; K_2HPO_4 – 0,5; лимоннокислый кальций – 10. рН среды – около 7,0.

Среду стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С, давлении 101,3 кПа в течение 20 мин. Мочевину стерилизуют отдельно сухим жаром при температуре 106 °С в течение 30 мин и затем вводят в стерильную среду.

Срок хранения среды – не более 3 мес; в холодильнике – не более 7 дней.

Вода пептонная

Состав (в граммах на 1 л водопроводной воды): пептон – 5,0; K_2HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5; NaCl – 0,5.

В термостойкую плоскодонную либо коническую колбу помещают 1 л водопроводной воды, вносят 5 г пептона и кипятят в течение 15 мин. В горячую жидкость вносят соли. Доводят рН до 7,0. После растворения солей раствор тщательно взбалтывают и фильтруют до полной прозрачности.

Фильтрат собирают в коническую колбу, химический стакан. Среду разливают в пробирки по 6 мл и стерилизуют в автоклаве в течение 25 мин при давлении 101,3 кПа.

Срок хранения среды – не более 2 мес; в холодильнике – не более 5 дней.

Мясо–пептонный (агар) бульон

10 г пептона и 5 г хлористого натрия добавляют к 1 л мясной воды. Устанавливают рН 7,0–7,2, кипятят, фильтруют через бумажный фильтр. Стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин. При выпадении осадка в мясо–пептонном бульоне его вторично фильтруют с последующей стерилизацией.

Для приготовления мясо–пептонного агара в 1 л мясо–пептонного бульона перед стерилизацией добавляют 15–20 г агара и кипятят на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения агара. Устанавливают рН 7,0–7,2, разливают в пробирки или флаконы и стерилизуют при температуре (121±1) °С в течение 20 мин.

Задание:

- 1) Приготовить препарат клубеньковых бактерий.
- 2) Приготовить окрашенный препарат *Azotobacter*.
- 3) Приготовить препарат аммонификаторов.
- 4) Провести качественную реакцию на аммонификацию с реактивом Несслера.
- 5) Провести качественную реакцию на аммонификацию с лакмусовой бумажкой.

Тема 9. Брожение: молочнокислое, маслянокислое, спиртовое

Цели занятия:

- 1) Ознакомиться с различными типами брожения: биохимией процесса, возбудителями, применением данных процессов в деятельности человека;

- 2) Микроскопировать возбудителей спиртового, молочнокислого и маслянокислого брожения;
- 3) Провести качественные реакции на продукты спиртового, молочнокислого и маслянокислого брожения.

Материалы и оборудование: микроскопы, предметные стекла, покровные стекла, спиртовки, спирт, культура дрожжей, колба емкостью 250 мл, 10 % раствор сахарозы, пробка с изогнутой трубкой, водяная баня (35–40 °С), пробирка с насыщенным раствором Са(ОН)₂, 1% раствор фенола, 1% раствор хлорного железа, кефир, капустный рассол, накопительная культура клостридий, раствор Люголя.

Прокариоты могут получать энергию двумя путями: за счет дыхания или за счет брожения.

Брожение – это анаэробный процесс превращения органических веществ, при котором АТФ образуется за счет субстратного фосфорилирования, а продукты расщепления субстрата могут одновременно служить как донорами, так и акцепторами водорода.

В зависимости от конечного продукта различают спиртовое, молочнокислое, маслянокислое, муравьинокислое, пропионовокислое брожение.

Спиртовое брожение

Общее уравнение спиртового брожения можно записать следующим образом:



Энергетический выход спиртового брожения составляет две молекулы АТФ на одну молекулу глюкозы.

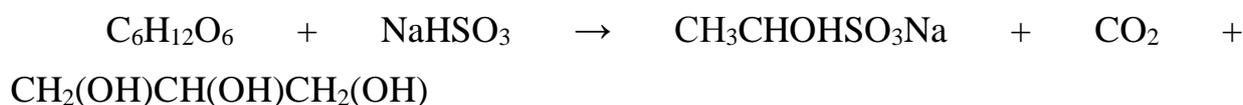
Спиртовое брожение вызывают различные микроорганизмы. Это могут быть прокариоты (*Zygomonas*, *Erwinia*, *Sarcina*) и эукариоты (*Aspergillus*, *Saccharomyces*). В отечественной промышленности для производства спирта и в хлебопечении чаще всего используют дрожжи

Saccharomyces. В Японии для производства рисовой водки сакэ используют плесневый гриб кодзи (*Aspergillus oryzae*), а в Мексике используют *Zygomonas mobilis* для сбраживания сока агавы в ходе приготовления текилы.

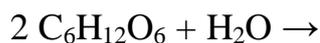
При изучении брожения на дрожжах Карл Нейберг показал, что при добавлении особых химических веществ состав продуктов брожения меняется. В соответствии с этим выделяют три формы сбраживания по Нейбергу:

1) классическая;

2) с бисульфитом натрия:



3) с подщелачиванием среды:



Вторая форма сбраживания по Нейбергу используется в промышленности для получения глицерина. Наличие третьей формы сбраживания по Нейбергу следует учитывать при производстве вин. Нужно контролировать pH, поскольку при подщелачивании среды начинается образование уксусной кислоты.

Также для дрожжей были открыты эффекты Пастера и Крэбтри.

- Эффект Пастера: В аэробных условиях брожение прекращается и начинается процесс дыхания.
- Эффект Крэбтри: В аэробных условиях может идти процесс брожения, но при определенных условиях: необходима высокая концентрация сахара (1,5 – 2,5 %).

Определение продуктов спиртового брожения

Определение углекислого газа

В колбу емкостью 250 мл наливают 50 мл 10 % раствора сахарозы вносят 10 мл исследуемой дрожжевой суспензии. Колбу плотно закрывают

пробкой с изогнутой трубкой и помещают на водяную баню (35–40 °С). Нижний конец трубки погружают в пробирку с насыщенным раствором $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (рис. 10). Через несколько минут в пробирке с известковой водой начинают поступать пузырьки газа. Следят за выделением пузырьков и помутнением жидкости. Известковая вода начинает интенсивно мутнеть за счет образования карбоната кальция.

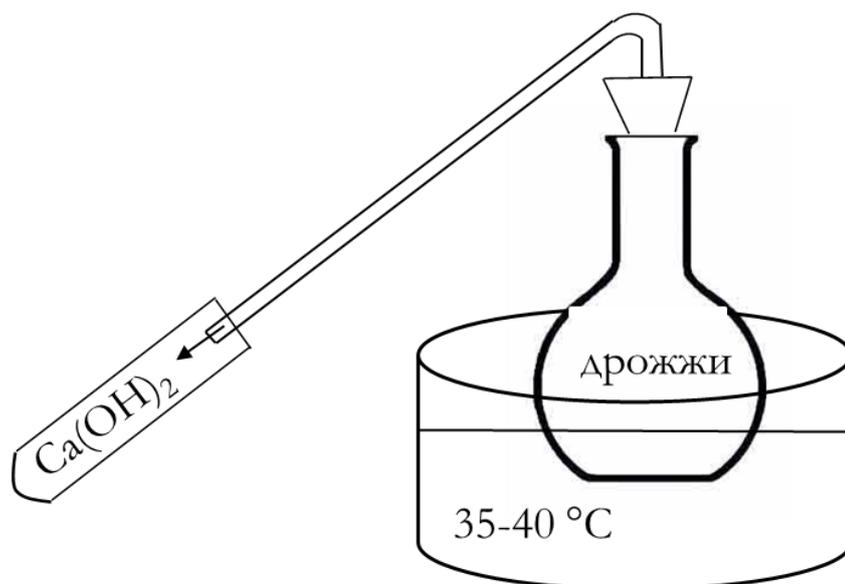


Рис. 10. Установка для качественной реакции на углекислый газ

Задание:

- 1) Приготовить препарат основного возбудителя спиртового брожения – дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
- 2) Провести качественную реакцию на углекислый газ.

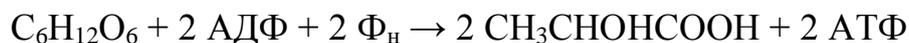
Молочнокислое брожение

При молочнокислом брожении пируват, образующийся при катаболизме глюкозы, восстанавливается NADH–зависимой дегидрогеназой до лактата (молочной кислоты), что и дало название данному типу брожения.

При молочнокислом брожении углеводы могут катаболизироваться разными способами, в связи с чем принято выделять «гомоферментативное брожение» и «гетероферментативное брожение». При гомоферментативном

брожении глюкоза метаболизируется по пути гликолиза, а при гетероферментативном – по пентозофосфатному пути.

В случае гомоферментативного брожения из одной молекулы глюкозы образуется две молекулы АТФ, и единственным конечным продуктом является молочная кислота:



Такой тип брожения характерен для *Lactobacillus acidophilus*, *L.delbrueckii*, *L.salivarius*, *Sporolactobacillus inulinus*, *Streptococcus lactis* и др.

При гетероферментативном брожении помимо молочной кислоты образуется ряд других продуктов: уксусная кислота, этанол и углекислый газ. Именно за счет гетероферментативного брожения при производстве кефира в нем может содержаться до 2% этанола. Гетероферментативные молочнокислые бактерии делятся на факультативных (*L.casei*, *L.plantarum*, *L.sake*, *Leuconostoc mesenteroides* и др.) и облигатных (*Lactobacillus brevis*, *L.kefir*, *L.fermentum* и др.). У первых имеется полный набор ферментов гликолиза, однако адаптивно не синтезируются два ключевых фермента: фруктозо–1,6–бисфосфат–альдолаза и триозофосфатизомераза. В случае облигатных гетероферментативных молочнокислых бактерий данные ферменты полностью отсутствуют.

Гетероферментативные молочнокислые бактерии рода *Bifidobacterium* преобладают в микробиоте желудочно–кишечного тракта грудных детей, и продукты осуществляемого ими брожения подавляют рост гнилостной микрофлоры. В коровьем молоке отсутствует N–ацетилглюкозамин, который является для этих бактерий незаменимым фактором роста. В настоящее время при дисбактериозе, вызванном, например, приёмом антибиотиков, назначают пробиотики, содержащие молочнокислые бактерии. Кроме того, бактерии рода *Lactobacillus*, обитающие во влагалище, за счёт образования молочной кислоты предотвращают размножение патогенной микрофлоры

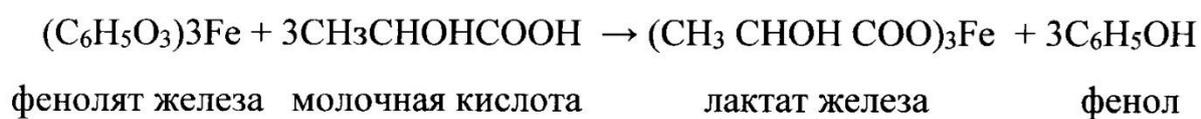
Молочнокислородное брожение используется в приготовлении различных продуктов на основе молока. Для приготовления сметаны используются мезофильные бактерии *Streptococcus lactis* и *Streptococcus cremoris*, йогуртов — термофильные *Streptococcus thermophilus* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ацидофилина — *Lactobacillus acidophilus*, творога, мягких сыров и сливочного масла — *Lactobacillus casei*, которая вызывает сворачивание белка казеина. Для производства кефира используется симбиотический комплекс из лактобактерий, стрептококков и дрожжей («кефирный гриб»). Спонтанное образование простокваши вызывает *Lactobacillus delbrueckii*, постоянно присутствующая в молоке.

Поскольку молочная кислота является естественным консервантом, молочнокислородное брожение используется при квашении овощей, засолке огурцов, в заквасках для ржаных сортов хлеба, при производстве высших сортов сырокопченых колбас, а также для получения чистого лактата. С помощью молочнокислородного брожения осуществляют заготовку кормов путем силосования.

Качественная реакция на молочную кислоту

Принцип метода. Молочная кислота с реактивом Уффельмана (фенол + хлорное железо) дает желто–зеленое окрашивание, вследствие образования молочно–кислого железа.

Схема реакции:



Порядок выполнения работы.

В две пробирки наливают по 1 мл 1% раствора фенола и добавляют по каплям 1% раствор хлорного железа до появления фиолетовой окраски. В одну из пробирок добавляют по каплям кефир, а в другую капустный рассол

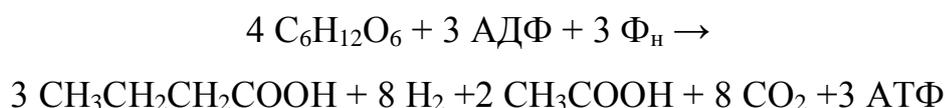
до появления желто–зеленой окраски. Изменение окраски свидетельствует о наличии молочной кислоты.

Задание:

- 1) Приготовить препараты молочнокислых бактерий из кефира, йогурта, капустного рассола.
- 2) Провести качественную реакцию на молочную кислоту с реактивом Уффельмана.

Маслянокислое брожение

Маслянокислое брожение протекает в соответствии с уравнением:



Энергетический выход маслянокислого брожения составляет три молекулы АТФ.

Возбудители маслянокислого брожения принадлежат к роду *Clostridium*. Это облигатные анаэробы с метаболизмом исключительно бродильного типа. Способны сбраживать углеводы, спирты, аминокислоты, пурины и ряд других соединений.

По используемым субстратам клостридии подразделяются на сахаролитические (гидролизуют полигликозиды: крахмал, пектин и целлюлозу) и протеолитические (гидролизуют белки и пептиды). К сахаролитическим клостридиям относится *C.pasteurianum*, к протеолитическим – *C.hystoliticum*. Некоторые клостридии могут быть одновременно сахаролитическими и протеолитическими.

Получение накопительной культуры клостридий

1. Нарезать небольшими ломтиками нечищенный сырой картофель.
2. Колбы объемом 50 мл заполнить ломтиками картофеля на 1/3.
3. Помещают в колбы по 1 г почвы.
4. Для нейтрализации среды (препятствует закислению среды) прибавить небольшое количество карбоната кальция (CaCO_3) или мела.

- Смесь залить кипятком на 2/3 и закупорить пробкой с газоотводной трубкой.
- На газоотводную трубку надеть пробирку для сбора газов и поместить в воду (рис. 11)

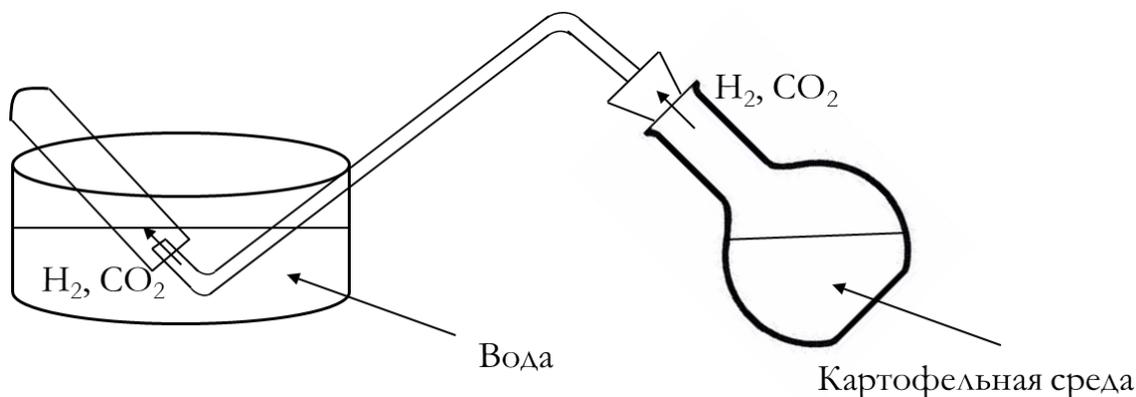


Рис. 11. Культивирование клостридий

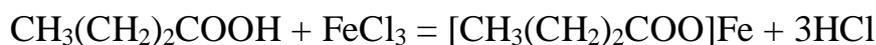
- Инкубировать систему в термостате при температуре +32⁰С в течение 2–7 суток.

Качественные реакции на маслянокислое брожение

Качественная реакция на масляную кислоту

Получение маслянокислого железа (реакция с FeCl₃).

Масляная кислота реагирует при нагревании с FeCl₃ с образованием маслянокислого железа. В пробирку наливают 3–5 мл сброженной жидкости, добавляют 1–2 мл 5%-ного хлорида железа и нагревают на пламени. Реакция идет по уравнению:



Раствор маслянокислого железа в отраженном свете приобретает буровато–коричневое окрашивание, а в проходящем свете – кроваво–красное.

Качественная реакция на водород

Снимают пробирку для сбора газов с газоотводной трубки, держа ее доньшком вверх. К горлышку пробирки подносят горящую спичку. Водород взрывается с небольшим хлопком.

Микроскопическое исследование маслянокислых бактерий

В исследовании жидкости при микроскопировании обнаруживают главным образом *Clostridium pasteurianum*, подвижные палочки с закругленными концами, одиночные и парные. В клетках этих бактерий содержится гранулеза. В старых культурах у одного из концов клетки обнаруживают споры.

Для определения гранул в клетке бактерий готовят препарат «Раздавленная капля».

1. На центр чистого обезжиренного предметного стекла пипеткой наносят каплю исследуемой жидкости. Каплю суспензии берут со дна пробирки трубочкой.

2. Этой же пипеткой равномерно, очень тонким слоем распределяют суспензию на 1/5 центральной части поверхности предметного стекла.

3. На предметное стекло наносят каплю концентрированного раствора Люголя и выдерживают в течение 30 с. Промывают водой и накрывают покровным стеклом.

4. Микроскопируют при увеличении 100х с масляной иммерсией. Гранулеза окрашивается раствором Люголя в синий цвет.

Задание:

- 1) Провести качественную реакцию на масляную кислоту.
- 2) Провести качественную реакцию на водород.
- 3) Приготовить и микроскопировать окрашенный препарат маслянокислых бактерий.

Тема 10. Анаэробное дыхание: нитратредуцирующие и сульфатредуцирующие бактерии

Цели занятия:

- 1) Ознакомиться с особенностями функционирования ЭТЦ прокариот при анаэробном дыхании;

- 2) Провести качественную реакцию на присутствие в почве денитрифицирующих бактерий;
- 3) Провести качественную реакцию на присутствие в пробах воды сульфатредуцирующих бактерий.

Материалы и оборудование: микроскопы, предметные стекла, покровные стекла, культура нитратредукторов, реактив Грисса, чашка Петри, шпатель, культура сульфатредукторов.

Дыхание – это процесс образования энергии, сопряженный с функционированием электронтранспортной цепи.

Сложные органические соединения расщепляются на мономеры (аминокислоты, жирные кислоты, моносахариды), которые через несколько реакций превращаются в глюкозу. Глюкоза окисляется до пирувата через гликолиз (рис. 12). При этом затрачивается две молекулы АТФ на активацию субстрата, а затем выделяется четыре молекулы АТФ. Таким образом, энергетический выход гликолиза составляет две молекулы АТФ на одну молекулу глюкозы.

Образующийся в ходе гликолиза пируват окисляется до ацетил–КоА в результате работы пируватдекарбоксилазного комплекса. При этом образуется одна молекула АТФ из каждой молекулы пирувата.

Ацетил–КоА полностью окисляется в цикле Креббса до углекислого газа и воды (рис. 12). При этом из одной молекулы ацетил–КоА образуется одна молекула АТФ, одна молекула $FADH_2$ и три молекулы $NADH$. $FADH_2$ и $NADH$ сбрасывают электроны в электронтранспортную цепь. В зависимости от конечного акцептора электронов при окислении одной молекулы $NADH$ образуется одна, две или три молекулы АТФ, а из одной молекулы $FADH_2$ образуется одна или две молекулы АТФ.

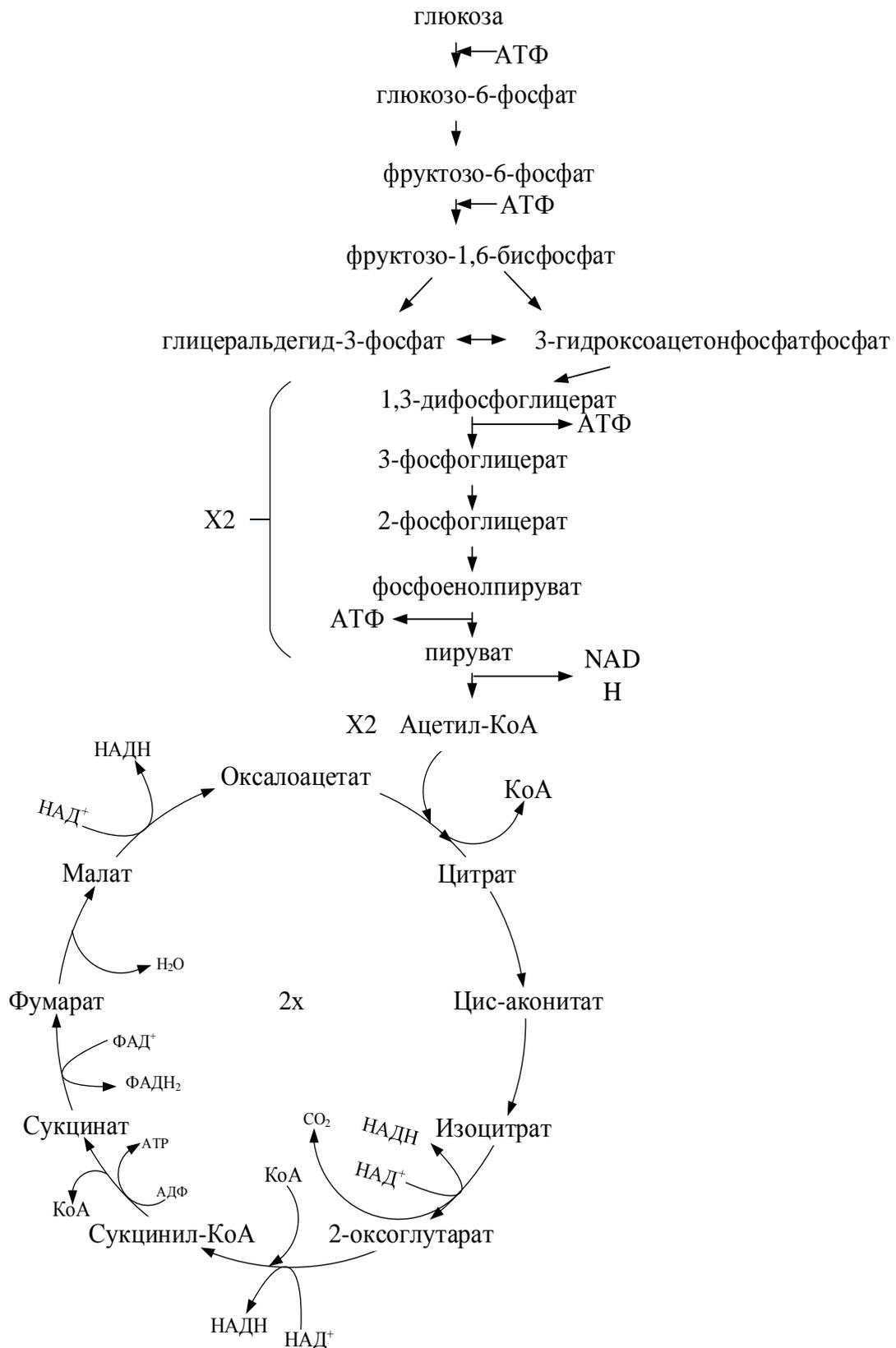


Рис. 12. Образование энергии в ходе гликолиза и цикла Кребса

Различают аэробное и анаэробное дыхание. При аэробном дыхании конечным акцептором электронов является кислород, а при анаэробном – какое-либо другое окисленное органическое или неорганическое соединение (фумарат, железо (III), сульфат, нитрат).

При аэробном дыхании электронтранспортная цепь функционирует полностью, и в ней имеется три пункта фосфорилирования (рис. 13). Соответственно, из каждой молекулы NADH образуется 3 АТФ, а из каждой молекулы FADH₂ – 2 АТФ.

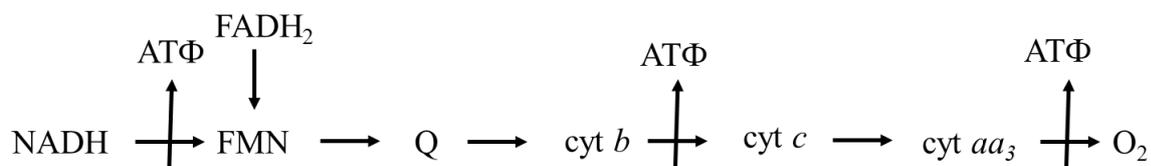


Рис. 13. Электронтранспортная цепь при аэробном дыхании

Рассчитаем количество АТФ, образующихся из одной молекулы глюкозы при аэробном дыхании (донор электронов – глюкоза, акцептор – кислород). В ходе гликолиза затрачивается 2 АТФ и образуется 4 АТФ и 2 NADH. Далее дважды работает пируватдекарбоксилазный комплекс и образует 2 молекулы NADH. Затем дважды работает цикл Кребса. При этом образуются 2 молекулы АТФ, 6 молекул NADH и 2 молекулы FADH₂. Всего образуется 4 молекулы АТФ, 10 молекул NADH и 2 молекулы FADH₂. В результате функционирования ЭТЦ образуется 10*3=30 молекул АТФ из молекул NADH и 2*2=4 молекулы АТФ из молекул FADH₂. Таким образом, энергетический выход аэробного дыхания на глюкозе составляет 4+30+4=38 молекул АТФ.

В случае анаэробного дыхания дыхательная цепь укорочена с конца: терминальный акцептор принимает электроны на уровне цитохрома *b* или цитохрома *c*, соответственно в дыхательной цепи будет два или один пункт фосфорилирования (рис. 14). Следовательно, анаэробное дыхание менее энергодающий процесс, чем аэробное.

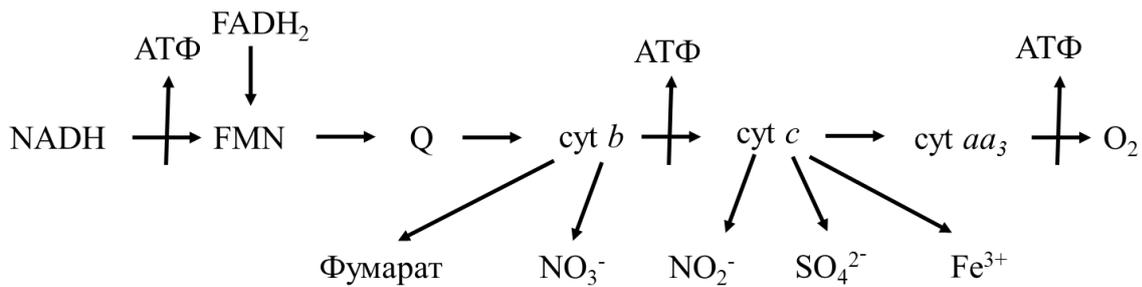


Рис. 14. Дыхательная цепь при анаэробном дыхании

Пример. Рассчитать количество образующихся АТФ в случае, если донором электронов выступает фруктозо-6-фосфат, а акцептором электронов – нитрат.

В этом случае затрачивается на одну молекулу АТФ меньше в ходе гликолиза. Нитраты принимают электроны с цитохрома *b*. Следовательно, из одной молекулы NADH образуется одна молекула АТФ, а из FADH₂ АТФ не образуется. Таким образом, общее количество АТФ: 5+10*1+2*0=15 АТФ.

Задание:

- 1) Рассчитать количество образующихся АТФ в случае, если донором электронов выступает пируват, а акцептором электронов – сульфат.
- 2) Рассчитать количество образующихся АТФ в случае, если донором электронов выступает глюкоза, а акцептором электронов – фумарат.
- 3) Рассчитать количество образующихся АТФ в случае, если донором электронов выступает цитрат, а акцептором электронов – Fe(III).
- 4) Рассчитать количество образующихся АТФ в случае, если донором электронов выступает глицеральдегид-3-фосфат, а акцептором электронов – нитрит.

Нитратредуцирующие (=денитрифицирующие) бактерии

Денитрифицирующие бактерии — бактерии, восстанавливающие нитраты до молекулярного азота. К ним относятся представители более 150 видов из 50 родов (в том числе *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus* и

Micrococcus). Это физиологическая, а не таксономическая группа. Они обитают в почве, воде и донных отложениях.

Полную денитрификацию до образования газообразных продуктов проводят только прокариоты. Все денитрифицирующие бактерии — факультативные анаэробы. Попадая в анаэробные условия, они переключаются с кислородного дыхания на менее энергодающее нитратное дыхание. В этом случае терминальным акцептором электронов служит нитрат, который принимает электроны на уровне цитохрома *b*. Нитрат последовательно восстанавливается до нитрита, окиси азота, закиси азота и газообразного азота (рис. 15).

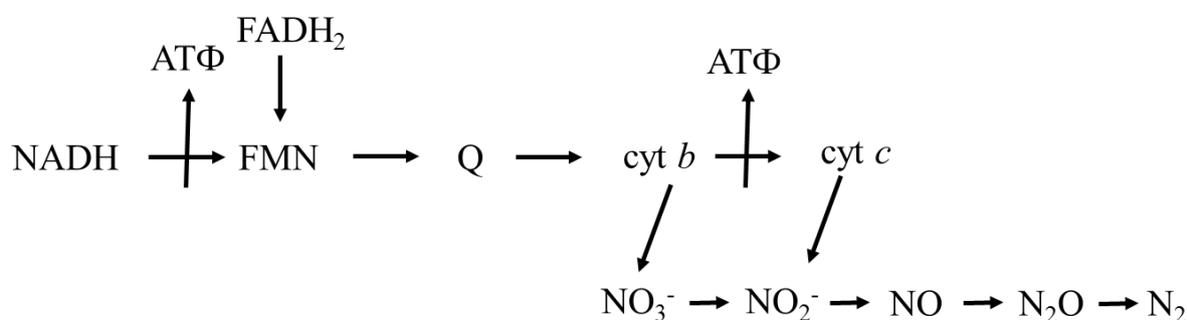


Рис. 15. Дыхательная цепь при нитратном и нитритном дыхании

Реакция восстановления нитрата в нитрит катализируется периплазматической нитратредуктазой Nar или мембрансвязанной нитратредуктазой Nar. Дальнейшее восстановление нитрита катализируется NO-образующей нитритредуктазой, редуктазой NO (Nor) и редуктазой N_2O (Nos).

Денитрификация имеет как положительное, так и отрицательное значение. Ее минусом является образование парникового газа N_2O , который способствует разрушению озонового слоя и удалению из почвы доступной формы азота. Плюс же заключается в удалении из почвы избытков нитрата, который в больших концентрациях является канцерогеном и может вызывать евтрофикацию водоемов.

Выявление денитрифицирующих бактерий

Присутствие в почве денитрифицирующих бактерий определяют по образованию разрывов в агаре из-за образования газообразных продуктов на твердой среде Березовой.

Среда Березовой

Состав (в граммах на 1 л дистиллированной воды): цитрат калия или натрия – 2,0; KNO_3 – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2,0 г; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – следы (1 мл 1%-ного раствора на 1 л среды). Среду стерилизуют при давлении 101,3 кПа в течение 20 мин. Срок хранения среды – не более 6 мес; в холодильнике – не более 10 дней.

В стерильные пробирки вносят по 1 г почвы, заливают расплавленной и охлажденной до 40–50 °С средой, закрывают резиновыми пробками и помещают в термостат на 37 °С. Одну пробирку для контроля заливают средой, но не вносят в нее почву. По истечении 7 суток в контрольной пробирке внешний вид среды не изменяется, в опытных пробирках появляются разрывы в агаре за счет образования газообразных продуктов в процессе денитрификации.

Качественная реакция на нитриты

Об образовании в процессе денитрификации нитрита из нитрата судят по качественной реакции на нитриты с реактивом Грисса. На планшет или в чашку Петри капают каплю реактива Грисса и каплю исследуемой среды. В случае присутствия в среде нитритов цвет реактива изменяется на розовый.

Сульфатредуцирующие (=десульфатирующие, =сульфидогенные) бактерии

Сульфатредукторы — прокариоты, способные к анаэробному дыханию с использованием в качестве конечного акцептора электронов сульфата. Они широко распространены в илах, а также в симбиотических анаэробных нишах. Это физиологическая, а не таксономическая группа. К ней относятся

бактерии (*Desulfobacter*, *Desulfovibrio*, *Desulfobulbus*, *Desulfonema*, *Desulfosarcina*, *Desulfomonas*, *Thermodesulfobacterium*) и археи (*Archeoglobus*, *Thermocladium*, *Caldivigra*).

Сульфатредукторы восстанавливают сульфат до сульфита, который в дальнейшем может окисляться до сульфида. Образование сульфита идет через промежуточный продукт аденозинфосфосульфат (АФС) (рис. 16). Этот процесс катализируется АТФ-сульфурилазой и АФС-редуктазой. Сульфат принимает электроны на уровне цитохрома с. Поэтому сульфатное дыхание еще менее энергодающее, чем нитратное.

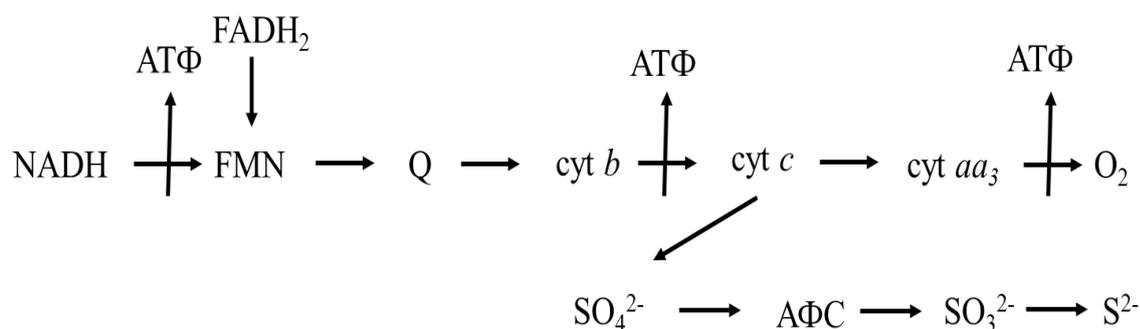


Рис. 16. Дыхательная цепь при сульфатном дыхании

Обнаружение сульфатредуцирующих бактерий

Сульфатредуцирующие бактерии, как *Desulfovibrio*, превращают сульфат в сульфид, который, реагируя с ионами железа, образует черный осадок. Для культивирования создают анаэробные условия, заполняя средой максимально пробирку с завинчивающейся крышкой

Состав среды для обнаружения сульфатредуцирующих бактерий в воде, грамм/литр:

Часть А:

Пептический перевар животной ткани 2,00;

Мясной экстракт 1,00;

Магния сульфат 2,00;

Натрия сульфат 1,50;

Калия гидрофосфат 0,50;

Кальция хлорид 0,10.

Гомогенный сыпучий порошок желтого цвета.

Часть В:

Железа аммонийного сульфат 0,392;

Натрия аскорбат 0,10;

Гомогенный сыпучий порошок кремово–белого цвета.

Часть С:

Натрия лактат 3,50.

Бесцветный раствор.

Конечное значение рН (при 25°C) $7,5 \pm 0,2$.

Готовая среда светло–желтого цвета, прозрачная, слегка опалесцирует.

Размешать 7,1 г порошка части А в 900 мл дистиллированной воды.

Стерилизовать автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин. В

день использования среды приготовить раствор части В в 100 мл

дистиллированной воды. Стерилизовать фильтрацией через фильтр с

диаметром пор 0,45 мкм. Асептично добавить 100 мл части В в 900 мл части

А. Затем добавить к полученной смеси часть С, стерилизованную отдельно

автоклавированием при 1,1 атм (121°C) в течение 15 мин. Тщательно

перемешать и асептично разлить полную среду по стерильным пробиркам с

завинчивающимися крышками, максимально заполняя их.

Задание:

- 1) Оценить рост нитратредукторов на твердой среде Березовой.
- 2) Провести качественную реакцию на образование нитритов.
- 3) Оценить рост сульфатредукторов из проб воды.

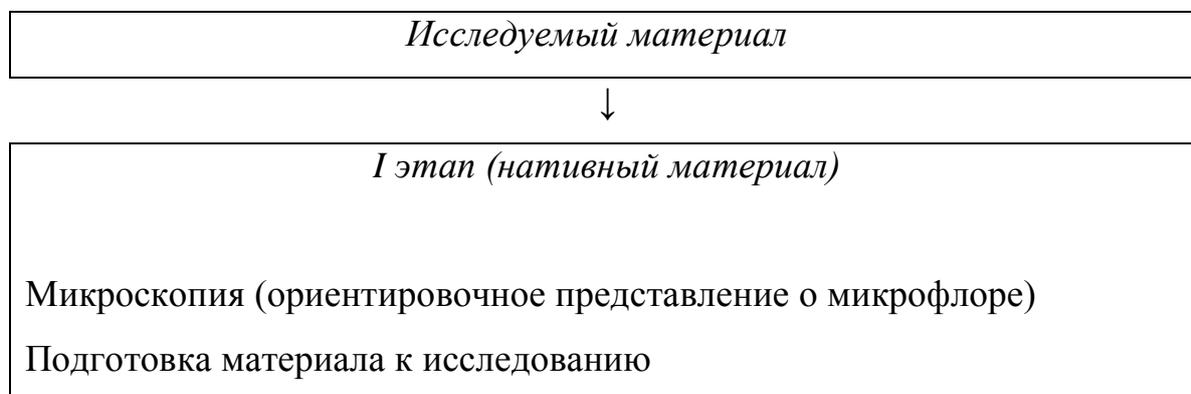
Тема 11. Методы обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов

Методы бактериологического исследования активно применяются для детального обследования больных, установления этиологического фактора инфекционного процесса, назначения рациональной терапии и определения ее эффективности. Разнообразие клинического материала и своеобразие микрофлоры отдельных органов определяют особенности методов бактериологического исследования, которые требуют применения специальных приемов отбора проб, посевов на питательные среды и проведения анализов.

В бактериологическое исследование клинического материала входит несколько этапов: отбор проб на исследование, посев на питательные среды, выделение чистой культуры, идентификация и дифференциация выделенных культур микроорганизмов, анализ результатов исследования (табл. 3).

Необходимо помнить, что образцы для исследований следует отбирать как можно раньше либо с учетом ритма циркуляции возбудителя; материал следует отбирать в объеме, достаточном для всего комплекса исследований; образцы следует доставлять в лабораторию незамедлительно, при относительно кратковременной транспортировке (не более 5 сут) образцы сохраняют на льду, при более длительной — при температуре -50°C .

Таблица 3. Схема выделения и идентификации чистых культур аэробных и анаэробных бактерий



Посев на среды обогащения

Посев на плотные питательные среды (получение колоний)



II этап (изолированные колонии)

Микроскопическое изучение колоний в проходящем и отраженном свете (величина, форма, цвет, прозрачность, положение, поверхность, консистенция, структура края)

Микроскопическое изучение колоний под малым увеличением микроскопа и в окрашенном мазке

Постановка пробы на аэротолерантность

Посев на скошенный питательный агар (выделение чистой культуры)



III этап (чистая культура)

Идентификация выделенной культуры по комплексу биологических свойств:

морфология и тинкториальные свойства

культуральные свойства

биохимические свойства

серологические свойства

фаголизабельность

чувствительность к антибиотикам

другие свойства

Микробиологическая диагностика необходима прежде всего для определения причины инфекционных заболеваний. Методы лабораторной диагностики микроорганизмов можно разделить на пять основных категорий: микроскопические, бактериологические (выделение чистой

культуры микроорганизмов и ее идентификация), биологические (заражение лабораторных животных с воспроизведением инфекционного процесса на чувствительных моделях (биопроба)), иммунологические (серологические, аллергические), молекулярно–генетические.

1. Изучение морфологии микроорганизмов

Морфологию микроорганизмов изучают путём микроскопии мазков из патологического материала и из культур, окрашенных по Граму, и др. методами.

Окрашенные клетки микроорганизмов резко отличаются от общего фона препарата, что позволяет установить морфологические особенности микроорганизмов (форму, размеры, наличие спор, жгутиков, капсул) и степень чистоты выделяемой культуры.

Существуют простые и сложные методы окраски. При простых методах можно использовать только одну краску.

Сложные методы окраски предусматривают последовательное использование нескольких красителей различного химического состава, что позволяет выявить определенные структуры бактериальной клетки. Унифицированным методом окраски является метод по Граму. Данный метод позволяет дифференцировать бактерий по различиям в строении клеточной стенки. Однако, при выявлении многих патогенных микроорганизмов она не является дифференциально–диагностической.

В живом состоянии микроорганизмы исследуют с целью выявления их формы, подвижности или определения прижизненной внутренней структуры. Изучают нативные и окрашенные препараты, используя методы «раздавленной» или «висячей» капли.

При изучении подвижности микроорганизмов необходимо отличать истинную подвижность от броуновского движения, которое является следствием ударов о бактерии движущихся в растворе молекул и выявляется

в виде колебаний. Многие подвижные микроорганизмы движутся очень быстро, что затрудняет наблюдение. Добавляя к суспензии микроорганизмов метилцеллюлозу, можно уменьшить скорость их движения и создать условия, при которых движение жгутиков становится видимым.

2. Изучение культуральных свойств микроорганизмов

В природе микроорганизмы существуют в смешанной популяции. Для изучения свойств микроорганизмов, определения их систематического положения необходимо прежде всего изолировать отдельные виды микробов и вырастить их в виде так называемых «чистых культур», а затем идентифицировать, т. е. установить их соответствие видам, описанным в специальных определителях.

Посев инокулята является первым этапом исследования. В практической работе для получения «чистых культур» микроорганизмов используют одну из модификаций метода высева на чашки со средой.

Эти методы основаны на том, что отдельные микроорганизмы развиваются на поверхности либо в глубине питательной среды, в которую добавлен агар или какое-нибудь другое гелеобразующее вещество.

Первичный высев материала на чашку Петри осуществляется одним из нижеперечисленных способов.

1. Посев петлей: посевной материал втирают петлей в поверхность среды у края чашки, избыток снимают, проколов петлей агар, а оставшийся материал рассеивают параллельными штрихами по стерильной поверхности среды (рис. 17).



Рис. 17. Посев штрихом

2. Посев шпателем: материал наносят на поверхность среды петлей или пипеткой, а затем стеклянным или металлическим шпателем тщательно втирают его по всей поверхности агара. После посева металлический шпатель прокаливают в пламени горелки, а стеклянный помещают в дезинфицирующий раствор.

3. Посев тампоном: тампон с исследуемым материалом вносят в чашку и круговыми движениями втирают его содержимое в поверхность среды, одновременно вращая тампон и чашку.

4. Посев на секторы: дно чашки расчерчивают на секторы, посев производят зигзагообразными движениями от края чашки к центру так, чтобы штрихи с одного сектора не переходили на другой (рис. 18).

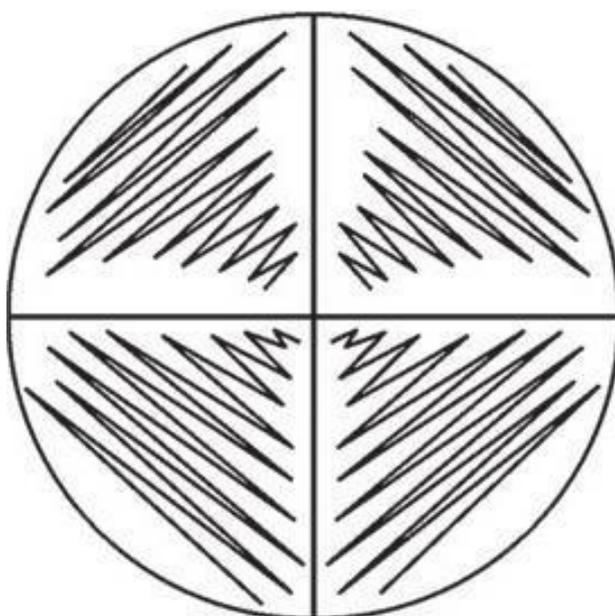


Рис. 18. Посев на секторы

5. Посев газоном: 1 мл исследуемого материала (жидкой бульонной культуры или взвеси микробов в физиологическом растворе) наносят пипеткой и тщательно распределяют по всей поверхности среды. Избыток материала отсасывают пипеткой и вместе с ней помещают в дезинфицирующий раствор.

При выделении чистых культур аэробов можно использовать методы, основанные не только на механическом разобщении бактерий, но и на их различиях по биологическим свойствам. Так, например, некоторые подвижные бактерии могут быстро распространяться по слегка влажной поверхности питательной среды, благодаря этому можно очистить их от неподвижных видов микробов. Иногда при выделении микроорганизмов из природных популяций полезно включить в среду вещества, избирательно подавляющие рост тех или иных микробов. Например, добавляя полиеновые антибиотики (нистатин) в среду, очищают бактериальные культуры, сильно загрязненные грибами.

Посевы инкубируются в термостате 18 – 24 ч. В течение этого времени из отдельных микробных клеток формируются изолированные колонии.

Второй этап исследования – изучение изолированных колоний. Колония – это изолированное скопление микробных клеток одного вида на

плотной питательной среде. Строение колоний является важным культуральным признаком при определении вида микроорганизмов, так как каждому виду микробов при росте на определенной плотной питательной среде присуща типичная форма колонии.

Колонии изучают невооруженным глазом в проходящем и отраженном свете и с помощью лупы или под микроскопом при малом увеличении. В проходящем свете их рассматривают со стороны дна чашки; отмечают величину колоний (крупные – от 4 – 5 мм в диаметре и более; средние – 2 – 4 мм; мелкие – 1 – 2 мм и карликовые – меньше 1 мм), их форму (правильная, круглая, неправильная, плоская, сферическая) и прозрачность (рис. 19).

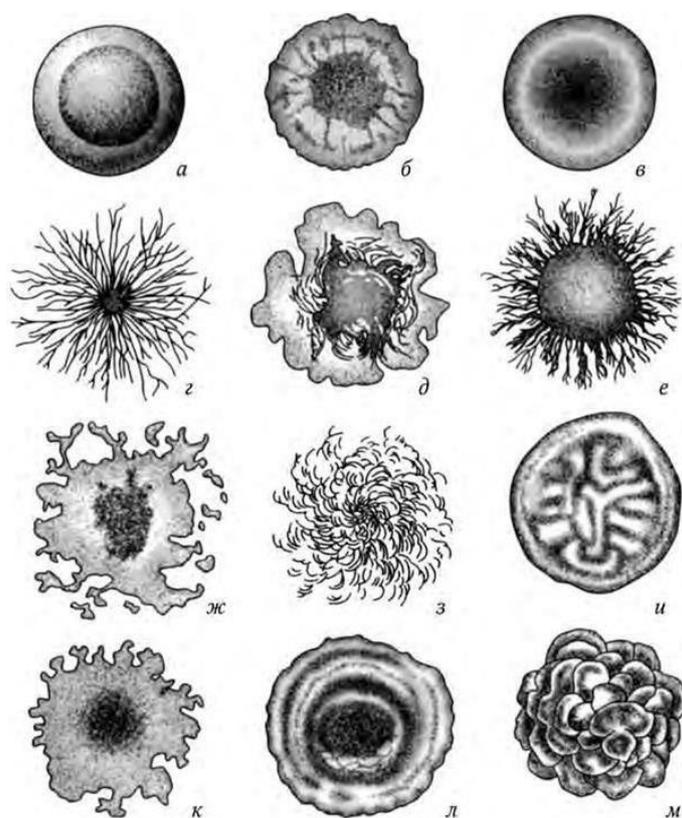


Рис. 19. Формы колоний микроорганизмов (по: Шильникова В. К., 2004): а – круглые; б – круглые с фестончатым краем; в – круглые с валиком по краю; г и д – ризоидные; е – с ризоидным краем; ж – амёбовидные; з – нитевидные; и – складчатые; к – неправильные; л – концентрические; м – сложные (Сбойчаков В.Б.)

В отраженном свете, рассматривая колонии со стороны крышки, определяют цвет (бесцветная, окрашенная), характер поверхности (гладкая, бугристая, блестящая, матовая), расположение колоний на поверхности среды (выпуклое, плоское, вдавленное).

Обращают внимание на характер краев колоний (ровные, фестончатые, зазубренные), структуру (гомогенная, зернистая, однородная или различная в центре и по периферии).

Различают два основных типа колоний бактериальной культуры: а) гладкие – S–тип (от англ. *smooth* – гладкий), характеризующийся круглой и выпуклой формой, гладкой поверхностью, влажной консистенцией; б) шероховатые – R–тип (от англ. *rough* – шероховатый), характеризующийся шероховатой поверхностью, неправильными краями, сухой консистенцией. Образуются из гладких S–форм в результате мутации.

Помимо этих двух основных типов колоний существует так называемый слизистый M–тип (от лат. *mucus* – слизистый), характеризующийся тягучей слизистой консистенцией; образуется в процессе диссоциации бактериальных культур. Часть изученной колонии берут для приготовления мазка, который окрашивают и микроскопируют. При подтверждении однородности состава колонии микроскопированием оставшуюся ее часть отвивают на скошенный агар для накопления чистой культуры.

Для идентификации культур, т. е. установления вида и типа бактерий, помимо морфологических и культуральных изучают биохимические, антигенные и другие свойства.

При выделении чистых культур облигатных анаэробов в основном пользуются методами глубинного посева в агар для исключения попадания кислорода в культуральную среду.

3. Изучение биохимических свойств бактерий

Изучение биохимических свойств выделенных микроорганизмов проводят на третьем этапе. Культуру микроорганизмов, выросшую на

скошенном агаре, проверяют на чистоту путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму. При этом обращают внимание на форму микроба, величину, расположение клетки. Используя специальное окрашивание выявляют споры, капсулы, включения и жгутики (см. тема 6, тема 7)

Совокупность полученной информации о свойствах бактерий сопоставляют с характеристикой определенных таксонов и дают заключение о таксономическом положении бактерий.

4. Иммунологические методы (серологические, аллергологические)

Серологические методы выявления специфических антител (АТ) и антигенов (АГ) возбудителя — важный инструмент в диагностике инфекционных заболеваний. Особую ценность они имеют в тех случаях, когда выделить возбудитель невозможно. При этом необходимо выявить повышение титров АТ, в связи с чем исследуют парные образцы сыворотки, взятые в интервале от 10 до 20 сут (иногда этот интервал может быть более длительным).

АТ обычно появляются в крови на 1—2-ю неделю заболевания и циркулируют в организме относительно долго, что позволяет использовать их выявление для ретроспективных эпидемиологических исследований.

Определение классов Ig четко характеризует этапы инфекционного процесса, а также может служить косвенным прогностическим критерием. Особое значение имеют методы выявления микробных АГ. В значимых количествах они появляются уже на самых ранних сроках, что делает их идентификацию важным инструментом экспресс-диагностики инфекционных заболеваний, а их количественное определение в динамике инфекционного процесса служит критерием эффективности проводимой антимикробной терапии. АГ многих возбудителей обладают сенсибилизирующим действием, что используют для диагностики

инфекционных заболеваний, а также при проведении эпидемиологических исследований.

Наибольшее распространение нашли кожно–аллергические пробы, включающие внутрикожное введение АГ (аллергена) с развитием реакции гиперчувствительности замедленного типа. Кожные пробы нашли применение в диагностике таких заболеваний как скарлатина, мелиоидоз, бруцеллез. Наиболее известна проба Манту, используемая как для диагностики туберкулеза, так и для оценки невосприимчивости организма к возбудителю.

В последние годы все шире применяются методы геноиндикации микроорганизмов, которые не требуют выделения чистых культур: метод ДНК–зондов, полимеразная цепная реакция (ПЦР) со специфическими праймерами.

5. Молекулярно–генетические методы идентификации микроорганизмов

Метод ДНК–ДНК–гибридизации является более важным для оценки генетического родства бактерий. Внутри одного вида бактерий степень генетической гомологии штаммов достигает 70–100%. Однако если в результате эволюционной дивергенции последовательностей нуклеотидных оснований геномов двух бактерий различаются в большей степени, то специфическая реассоциация ДНК–ДНК становится такой слабой, что не поддается измерению. В таком случае *гибридизация ДНК–рРНК* позволяет значительно увеличить круг организмов, у которых можно определить степень генетической гомологии благодаря тому, что на относительно небольшом участке бактериального генома, кодирующем рибосомные РНК, исходная последовательность оснований сохраняется значительно полнее, чем на других участках хромосомы. В итоге методом ДНК–рРНК–гибридизации часто обнаруживают довольно высокую гомологию геномов

бактерий, у которых реассоциация ДНК–ДНК не выявляет заметной гомологии.

Для идентификации бактерий иногда используют также метод *ДНК–зондов* – разновидность метода молекулярной гибридизации ДНК–ДНК. Реакция гибридизации ведется в этом случае не между двумя препаратами тотальной ДНК, а между фрагментом нуклеотидной последовательности ДНК (зондом), включающим генетический маркер (ген), ответственный за какую–то определенную функцию (например, устойчивость к антибиотику), и ДНК изучаемой бактерии. Самым распространенным способом создания генных зондов является выделение специфических фрагментов путем молекулярного клонирования. Для этого вначале создают банк генов изучаемой бактерии, затем отбирают нужный клон из суммы фрагментов ДНК. Далее выбранный фрагмент ДНК сшивают с подходящей плазмидой, и полученную рекомбинантную плазмиду вводят в удобный штамм бактерий (например, в *E.coli*). Из биомассы бактерии, несущей ДНК зонд, выделяют плазмидную ДНК и метят ее радиоизотопной меткой. Затем осуществляют гибридизацию генетического зонда с ДНК бактерии. Образовавшиеся гибридные участки проявляют методом автордиографии. По относительной частоте гибридизации генетического маркера с хромосомой той или иной бактерии делают заключение о генетическом родстве этих бактерий с исследуемым штаммом.

Для идентификации бактерий и создания филогенетической системы их классификации наиболее широкое распространение и значение получил *метод анализа нуклеотидных последовательностей в рибосомальных РНК*. Молекулы 5S, 16S и 23S рРНК содержат участки с самой высокой степенью генетической стабильности. Считается, что они находятся вне механизма естественного отбора и эволюционируют только в результате спонтанных мутаций, происходящих с постоянной скоростью. В случае анализа 5S рРНК

обычно определяют полную последовательность нуклеотидов, которая в этой молекуле у прокариот составляет 120 нуклеотидов. При исследовании 16S и 23S рРНК, содержащих 1500 и 2500 нуклеотидов соответственно, часто проводят анализ олигонуклеотидов, полученных из этих молекул при помощи специфических рестриктаз.

В настоящее время также разработаны *иммуофлуоресцентные методы (ИФМ)*, позволяющие выявить интересующий исследователя организм без выделения в чистую культуру. В основе любых модификаций ИФМ используется взаимодействие антиген–антитело, которое соединено с флуоресцирующим красителем. Специфичность реакции антиген–антитело высока, поэтому и вероятность выявления микроорганизма в природных образцах или накопительных культурах тоже высока. Недостатком являются относительно долгая процедура приготовления сывороток с красителями и существование перекрестных реакций.

Недостатков ИФМ лишен метод, основанный на взаимодействии флуоресцентно окрашенных олигонуклеотидов с соответствующими участками 16S рРНК целых клеток (метод FISH – Fluorescent in situ hybridization).

При флуоресцентной гибридизации *in situ* используют ДНК–зонды, которые связываются с комплементарными мишенями в образце. В состав ДНК–зондов входят нуклеозиды, меченные флюорофорами (прямое мечение) или такими конъюгатами, как биотин или дигоксигенин (непрямое мечение). При прямом мечении связавшийся с мишенью ДНК–зонд можно наблюдать при помощи флуоресцентного микроскопа сразу по завершении гибридизации. В случае непрямого мечения необходима дополнительная процедура окрашивания, в ходе которой биотин выявляют при помощи флуоресцентно–меченного авидина или стептавидина, а дигоксигенин — при помощи флуоресцентно–меченых антител. Интенсивность

флюоресцентного сигнала зависит от многих факторов — эффективности мечения зондом, типа зонда и типа флюоресцентного красителя.

Тема 12. Антибиотикочувствительность

Цели занятия:

- 1) Ознакомиться с понятием «антибиотики», видами антибиотиков и методами определения антибиотикочувствительности;
- 2) Определить спектр действия антибиотика методом дорожки по Флемингу;
- 3) Определить антибиотикочувствительность методом дисков.

Материалы и оборудование: спиртовки, спирт, чашки Петри со стерильным МПА, скальпели, пробирки со стерильным МПА, микробиологическая петля, культуры кокков и палочек, фильтровальная бумага, ножницы, растворы антибиотиков (бензилпенициллин, стрептомицин, рифампицин, диокситоцин, по 10 мкг/л), пинцет.

Антибиотики (от греч. *anti* – против, *bios* – жизнь) – продукты жизнедеятельности живых организмов, способные избирательно убивать микроорганизмы или подавлять их рост.

Антибиотики могут оказывать на микроорганизмы бактериостатическое и бактерицидное действие. Бактерицидное действие антибиотиков вызывает гибель микроорганизмов, а бактериостатическое – подавляет или задерживает их размножение. Характер действия зависит как от антибиотика, так и от его концентрации.

Механизм антимикробного действия антибиотиков разнообразен: одни нарушают синтез клеточной стенки бактерий (пенициллин, цефалоспорины), другие тормозят процессы синтеза белка в клетке (стрептомицин, тетрациклин, левомицетин), третьи угнетают синтез нуклеиновых кислот в бактериальных клетках (рифампицин и др.).

Для каждого антибиотика характерен спектр действия, т. е. препарат может оказывать губительное действие на определенные виды микроорганизмов. Антибиотики широкого спектра активны в отношении различных групп микроорганизмов (тетрациклины) или угнетают размножение многих грамположительных и грамотрицательных бактерий (стрептомицин и др.). Ряд антибиотиков действует в отношении более узкого круга микроорганизмов, например, к полимиксину чувствительны преимущественно грамотрицательные бактерии.

По спектру действия антибиотики разделяют на антибактериальные, противогрибковые и противоопухолевые.

Антибактериальные антибиотики угнетают развитие бактерий и составляют наиболее обширную группу препаратов, различных по химическому составу. Для лечения инфекционных болезней, вызываемых бактериями, чаще используют антибиотики широкого спектра действия: тетрациклины, левомицетин, стрептомицин, гентамицин, канамицин, полусинтетические пенициллины и цефалоспорины и другие препараты.

Противогрибковые антибиотики (нистатин, леворин, амфотерицин В, гризеофульвин) оказывают угнетающее действие на рост микроскопических грибов, так как нарушают целостность цитоплазматической мембраны микробных клеток. Применяются для лечения грибковых заболеваний.

Противоопухолевые антибиотики (рубомидин, брунеомидин, оливомидин) угнетают синтез нуклеиновых кислот в животных клетках и используются для лечения различных форм злокачественных новообразований.

Биологическую активность антибиотиков измеряют в международных единицах действия (ЕД). За единицу активности антибиотика принимают наименьшее количество препарата, которое оказывает антимикробное действие на чувствительные к нему тест-бактерии

(например, для пенициллина – золотистый стафилококк, стрептомицина – кишечная палочка и т. п.). В настоящее время единицы активности антибиотиков выражают в микрограммах чистого препарата. Так, за единицу активности пенициллина принимают 0,6 мкг, а для большей части антибиотиков 1 ЕД соответствует 1 мкг (стрептомицин и др.).

Некоторые антибиотики (пенициллин, стрептомицин и др.), введенные в организм больного, вызывают аллергию, нарастающую по мере применения препарата. Аллергические реакции развиваются в виде сыпи–крапивницы, отеков век, губ, носа, дерматитов. Наиболее грозным осложнением является анафилактический шок, от которого может наступить смерть больного.

Введение в организм больших доз антибиотиков широкого спектра действия, как правило, сопровождается и гибелью представителей нормальной микрофлоры дыхательных путей, кишечника и других органов. Это приводит к изменению обычных антагонистических отношений между микроорганизмами в естественных условиях. В результате этого условно–патогенные бактерии (стафилококки, протей) и грибы рода *Candida*, устойчивые к этим антибиотикам, могут активизироваться и вызывать вторичные инфекции. Так возникают грибковые поражения – кандидозы кожи, слизистых оболочек, внутренних органов; дисбактериозы (нарушения нормального состава микрофлоры).

Для предотвращения развития кандидамикозов антибиотики вводят с противогрибковыми препаратами, например нистатином и др. Применение препаратов, приготовленных из представителей нормальной микрофлоры (колибактерин, бифидумбактерин, бификол) после приема антибиотиков, предупреждает развитие дисбактериоза.

Длительное лечение и применение антибиотиков может оказывать токсическое действие на организм больного: тетрациклины могут вызвать поражение печени, левомицетин – органов кроветворения, стрептомицин в

ряде случаев поражает вестибулярный и слуховой анализаторы, цефалоспорины способны нарушать функции почек. Многие антибиотики часто вызывают гиповитаминоз и раздражение слизистой оболочки желудочно–кишечного тракта.

Антибиотики могут оказывать вредное действие на развитие плода, особенно у женщин, употреблявших антибиотики в первый период беременности. Прямое влияние на организм плода оказывают антибиотики группы тетрациклина.

Часто при лечении антибиотиками происходит превращение чувствительных к антибиотику микроорганизмов в устойчивые (резистентные) формы. Приобретенная устойчивость бактерий к антибиотику передается по наследству новым популяциям бактериальных клеток.

Методы определения антибиотикочувствительности.

Метод дорожки по Флемингу

Метод применяют для определения спектра действия антибиотика. В чашке Петри с МПА стерильным скальпелем вырезают дорожку шириной 1 см и удаляют ее. Затем в пробирку с растопленным и охлажденным до 42–45° С мясопептонным агаром вносят определенную концентрацию раствора антибиотика. Содержимое пробирки перемешивают и выливают в дорожку так, чтобы жидкость не выходила за ее пределы. После застывания агара перпендикулярно к дорожке засевают петлей культуры нескольких исследуемых микроорганизмов. Посевы помещают в термостат на 18–24 ч.

Учет результатов. Чувствительные к препарату культуры начинают расти лишь на некотором расстоянии от дорожки, нечувствительные растут до самого края.

Задание:

- 1) Залить чашку Петри МПА. Скальпелем вырезать дорожку шириной 1 см. Удалить дорожку.

- 2) Пробирку с растопленным и охлажденным до 42–45° С мясопептонным агаром внести определенную концентрацию раствора антибиотика. Убедиться, что агар застыл.
- 3) Перпендикулярно к дорожке засеять петлей культуры исследуемых микроорганизмов.
- 4) Посевы помещают в термостат на 18–24 ч
- 5) Определить спектр действия пенициллина методом дорожки по Флемингу.

Библиографический список

1. Емцев, В. Т. Микробиология : учебник для бакалавров / В. Т. Емцев. – 8–е изд. – Москва : Издательство Юрайт, 2016. – 445 с.
2. Коротяев, А. И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев. – Общество с ограниченной ответственностью " Издательство" СпецЛит", 2008.
3. Куранова Н. Г., Купатадзе Г. А. Микробиология. Часть 1. Прокариотическая клетка. – 2013.
4. Нетрусов А. И. Микробиология: [учебник для студентов высшего профессионального образования по направлению "Педагогическое образование"] / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – Москва : Академия, 2012. – 378, [1] с. : ил. – (Высшее профессиональное образование. Бакалавриат) (Педагогическое образование). – Библиогр.: 375 с.
5. Сбойчаков, В.Б. Микробиология с основами эпидемиологии и методами микробиологических исследований [Текст] : учебник для средних медицинских учебных заведений / В. Б. Сбойчаков. – 3–е изд., стер. – Санкт–Петербург : СпецЛит, 2015. – 606 с.
6. Черкес, Ф.К. Микробиология : [учебник для учащихся фельдшерско–лаборантских и санитарно–фельдшерских отделений медицинских училищ] / Ф. К. Черкес, Л. Б. Богоявленская, Н. А. Бельская ; под ред. Ф. К. Черкес. – Москва : Медицина, 1986. – 511 с.